

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal

**LA PERFUSIÓN DE BRANQUIAS COMO MODELO DE
VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE AGUA Y SU
RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN INTENSIVA DE
TRUCHAS**

José Antonio Martínez-Pereda Calvo

Madrid, 1996

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR

Reunido el Tribunal axaminador,
constituido por los miembros que suscri-
ben la presente Acta, el aspirante defen-
dió su Tesis doctoral, que había escrito
libremente sobre el siguiente tema:

1) La influencia de la antigüedad
como modelo de valoración
de calidad de la obra.

Ha sido dirigida por:

Terminada la lectura y contestadas
por el tesando las objeciones formula-
das por los Sres. Miembros del Tribunal,
este calificó dicho trabajo con la nota de:


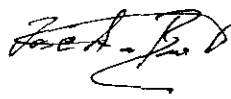

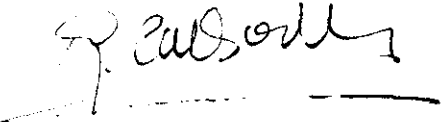
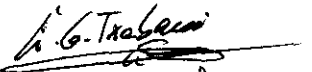
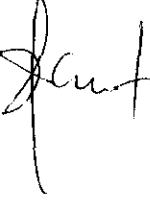
Apto Cum Laude por Unanimitad

Madrid, 17 de Mayo de 1966

EL PRESIDENTE

LOS VOCALÉS

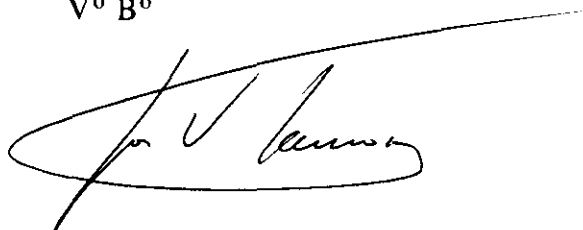
EL SECRETARIO


El Tesando






Tesis presentada por José Antonio Martínez-Pereda Calvo para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid.

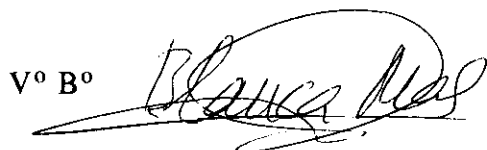
Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Area de Toxicología del Medio Ambiente del Centro de Investigación en Sanidad Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (CISA-INIA), bajo la dirección del Dr. D. José Vicente Tarazona Lafarga

Vº Bº

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. V. Tarazona', with a large, sweeping horizontal stroke underneath.

y presentada como tutora por la Dra. D^a. Blanca Mas Alvarez

Vº Bº

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Blanca Mas', with a large, sweeping horizontal stroke underneath.



MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA
AGRARIA Y ALIMENTARIA
CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL

D. José Vicente Tarazona Lafarga, Doctor en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, y Coordinador del Area de Toxicología del Medio Ambiente del CISA-INIA

INFORMA

que el trabajo presentado por el Licenciado D. José Antonio Martínez-Pereda Calvo para optar al Grado de Doctor en Veterinaria, titulado "La perfusión de branquias como modelo de valoración de la calidad del agua y su relación con la producción intensiva de truchas" ha sido realizado bajo mi dirección, en este Area de Toxicología del Medio Ambiente, y que lo considero perfectamente apto para su exposición y defensa.

Valdeolmos a 15 de Abril de 1996

Fdo: Dr. José V. Tarazona Lafarga

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1.1. Acuicultura.	2
1.2. Importancia de la calidad del agua en la acuicultura	3
1.3. Contaminación.	6
1.3.1. Metales pesados.	7
1.3.2. El cobre.	9
1.3.3. Nitritos.	13
1.3.4. Xileno de almizcle.	16
1.4. Toxicocinética.	18
1.4.1. Modelos compartimentales.	19
1.4.2. Modelos no compartimentales.	23
1.4.3. Modelos fisiológicos.	23
1.5. Enfermedades infecciosas.	24
1.5.1. <i>Yersinia ruckeri</i>	25
1.5.2. <i>Renibacterium salmoninarum</i>	27
1.6. Metodos alternativos in vitro.	30
1.7. La branquia como sistema fundamental.	31
1.8. La perfusión de branquias.	34
1.8.1. Tipos de preparaciones.	35
1.8.2. Preparación de branquias en cabeza aislada.	36
1.8.3. Medida de la viabilidad de la técnica.	37
1.8.4. Estudios realizados.	38

1.8.5. Utilidad de esta técnica.43
1.9. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION45
II. MATERIALES Y METODOS46
2.1. Materiales.47
2.1.1. Animales.47
2.1.2. Resumen de los materiales empleados47
2.2. Métodos49
2.2.1. Perfusión branquial.49
2.2.1.1. Circuitos.49
2.2.1.2. Fase quirúrgica.51
2.2.2. Desarrollo experimental.53
2.2.2.1. Eliminación <i>in vivo</i> de nitritos.53
2.2.2.2. Eliminación <i>in vitro</i> de nitritos.54
2.2.2.3. Metabolismo <i>in vitro</i> de nitritos.54
2.2.2.4. Absorción <i>in vivo</i> de nitritos.55
2.2.2.5. Absorción <i>in vitro</i> de nitritos.55
2.2.2.6. Eliminación <i>in vitro</i> de cobre.56
2.2.2.7. Eliminación <i>in vitro</i> de cobre con células.56
2.2.2.8. Absorción <i>in vitro</i> de cobre.57
2.2.2.9. Absorción <i>in vitro</i> de xileno de almizcle.57
2.2.2.10. Eliminación <i>in vitro</i> de xileno de almizcle58
2.2.2.11. Eliminación de xileno de almizcle con células..58
2.2.2.12. Ingreso de partículas vía branquial.59
2.2.2.13. Ingreso de bacterias vía branquial.60

2.2.2.13.1. Cultivo.60
2.2.2.13.2. Inactivación de las bacterias.60
2.2.2.13.3. Perfusión branquial.61
2.2.2.13.4. Inmunohistoquímica.62
2.3. Análisis, cálculos y estadísticas.64
2.3.1. Análisis y cálculos estadísticos.64
2.3.2. Cálculos cinéticos.65
III. RESULTADOS71
3.1. Eliminación <i>in vivo</i> de nitritos.72
3.2. Eliminación <i>in vitro</i> de nitritos.74
3. Metabolismo/captación <i>in vitro</i> de nitritos por los eritrocitos.77
3.4. Comparación <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i>79
3.5. Absorción <i>in vivo</i> de nitritos.80
3.6. Absorción <i>in vitro</i> de nitritos.81
3.7. Eliminación <i>in vitro</i> de cobre.85
3.8. Eliminación <i>in vitro</i> de cobre con células.87
3.9. Absorción <i>in vitro</i> de cobre.90
3.10. Absorción <i>in vitro</i> de xileno de almizcle.90
3.11. Eliminación <i>in vitro</i> de xileno de almizcle.92
3.12. Eliminación de xileno de almizcle con células.93
3.13. Ingreso de partículas vía branquial.95
3.14. Ingreso de bacterias vía branquial..96
IV. DISCUSION99

4.1. Utilidad de la perfusión branquial para la producción intensiva de truchas..	100
4.2. La perfusión branquial como alternativa a los estudios <i>in vivo</i>	102
4.2.1. Empleo de la técnica en toxicología.	104
4.2.2. Empleo de la técnica en los estudios toxicocinéticos. Aproximación cuantitativa.	105
4.3. La perfusión branquial como modelo para valorar mecanismos toxicocinéticos.	109
4.4. La perfusión branquial como modelo para el estudio del ingreso de bacterias..	113
4.4.1. Uso de partículas inertes.	115
4.4.2. Utilización de bacterias.	116
 V. CONCLUSIONES	 119
 VI. BIBLIOGRAFIA	 123

INTRODUCCIÓN

1.1. Acuicultura.

La necesidad de alimentos proteicos en los países en desarrollo, así como la tendencia hacia dietas más sanas, con menos grasas, en los países desarrollados, presagia un continuado aumento de la acuicultura (Tomasso y Brune, 1991). En este sentido la FAO ha hecho un llamamiento al desarrollo de la acuicultura como una alternativa para la obtención de proteínas de origen animal.

La producción acuícola mundial ha crecido en los últimos diez años de 6.9 millones de toneladas a 15.9. Por otra parte, el 21 % del pescado que se consume es producido en cautividad. La acuicultura continental representa el 65 % del total. La importancia de la acuicultura continental ha crecido de tal modo que la producción está un 50 % por encima de las capturas (Josupeit, 1995).

Dentro de la producción acuícola, la salmonicultura es el más practicado y con un grado de desarrollo técnico y una explotación más racional. Los salmónidos, principalmente trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y salmón atlántico *Salmo salar*, son los más importantes en piscicultura, representando un 40 % de la producción total. La producción anual de trucha arco iris fue de 200.000 toneladas en 1985 (Shepherd, 1988).

En el siglo pasado, ante el aumento de la pesca fluvial se pensó en desarrollar piscifactorías a fin de repoblar las aguas. Luego la demanda para el consumo hizo multiplicar la producción de truchas y la hizo más intensiva.

Diversas razones hacen de nuestro país un lugar muy adecuado para la acuicultura. La producción piscícola se ha incrementado notablemente en los últimos 30 años y, a pesar de los problemas económicos coyunturales, el ascenso de la piscicultura en detrimento de la pesca tradicional es imparable.

Aun cuando se produce una gran variedad de especies en España, la producción de trucha es la que reviste una mayor importancia económica. Está orientada principalmente a la producción de ejemplares para el consumo y, en menor medida, para la repoblación y la producción de huevos y alevines.

La producción de trucha en España se ha incrementado de 14.000 toneladas en 1986 a 19.700 en 1994. Son casi 115.000 toneladas anuales la producción total de los países mediterráneos (Lacroix, 1995).

Oncorhynchus mykiss (Walbaum) es la especie más criada en aguas continentales. Fue importada de América del Norte, se ha adaptado a nuestras condiciones climatológicas y tiene un desarrollo más rápido que la trucha autóctona *Salmo trutta fario*.

1.2. Importancia de la calidad del agua en la acuicultura.

La calidad del agua es uno de los factores más importantes a la hora de considerar la cría intensiva de peces, pues de ella dependen una serie de factores que condicionan tanto la productividad como la aparición y desarrollo de procesos patológicos, bien sean de tipo infeccioso o toxicológico (Rosenthal, 1989).

Es esencial una mayor comprensión de las relaciones entre productividad acuática y calidad del agua para asegurar una continuidad en el crecimiento de la acuicultura (Tomasso y Brune, 1991).

La calidad de agua en los modernos sistemas de producción tiene una incidencia directa en la salud y el crecimiento de las especies criadas y de este modo juega un papel en el desarrollo de los sistemas productivos. Esta relación puede definirse gráficamente como sigue (Rosenthal, 1989):

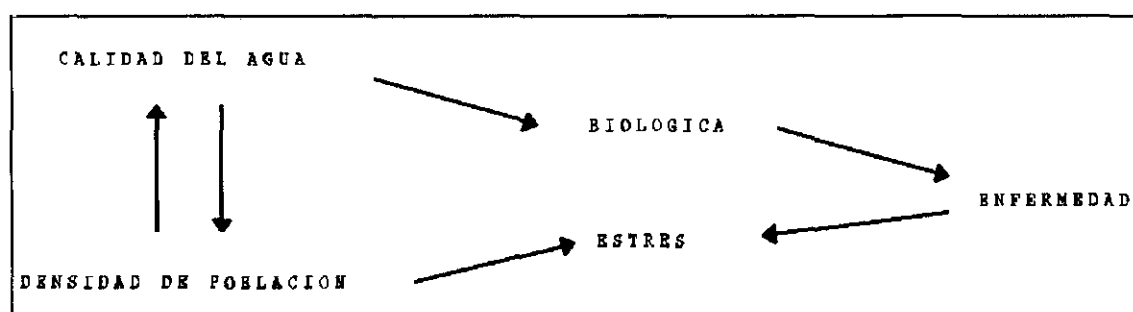


Fig. 1.

Cualquier elemento tóxico en el ambiente puede causar una respuesta de estrés, lo que reduce la capacidad del organismo para expresar su potencial genético de desarrollo afectando a los objetivos de los piscicultores (Schreck y Hiram, 1991).

Si los costes metabólicos se incrementan en respuesta a los tóxicos, los procesos de producción deben reducirse. Esta reducción puede ser mayor aún si la exposición al tóxico conduce a una disminución en el apetito, que es uno de los primeros signos de estrés por pobres condiciones ambientales.

La construcción de los sistemas de cría intensiva requiere complejas infraestructuras y los inversores están forzados a maximizar la producción de biomasa por unidad de volumen para mantener la viabilidad económica. Por esto, los piscicultores tienden a utilizar densidades por encima del límite. Con una creciente densidad de población, la calidad del agua desciende y tiende a fluctuar dramáticamente dentro del sistema (Rosenthal, 1989).

La calidad de agua en su más amplio sentido incluye todas sus características físicas, químicas y biológicas (Boyd, 1981), y en el caso de una piscifactoría industrial de trucha arco iris este concepto no puede restringirse (Blanco, 1994). Sin embargo, hasta ahora la calidad del agua se ha considerado habitualmente como una serie limitada de parámetros como la temperatura, el oxígeno disuelto, la salinidad, la alcalinidad, la dureza, etc. Pero actualmente, dada la extensión de la contaminación del medio acuático y el riesgo de determinados contaminantes, la ubicuidad de microcontaminantes orgánicos y metales pesados hace considerar también estos factores.

La trucha arco iris se cría normalmente con un flujo continuo de agua para mantener la calidad de la misma en la unidad de cultivo. De este modo, las piscifactorías están expuestas a dos tipos de agresiones en relación con la calidad de agua: una, los propios efectos de sus metabolitos; otra, los posibles contaminantes que entran con el torrente de agua. Por ello, la calidad de agua se ha considerado uno de los factores limitantes para la acuicultura.

La muerte de los peces no es la única respuesta a los problemas de calidad del agua. Problemas a una escala subletal que afectan al crecimiento y a los índices de conversión pueden originar costes de todo tipo para las piscifactorías. Los efectos subletales más

importantes son aquellos que afectan a la reproducción, crecimiento, y susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Tarazona y Muñoz, 1995).

Condiciones habituales en la piscicultura industrial como altas densidades de peces, estrés por manejo, etc. implican que las enfermedades infecciosas se conviertan en un riesgo constante, por afectar a las respuestas inmunológicas del pez aumentando la susceptibilidad a bacterias (Plumb, 1984), virus (Hetrick *et al.*, 1979) y parásitos (Carballo y Muñoz, 1991). La reducción en la inmunocompetencia puede estar asociada a la respuesta de estrés producida por la exposición a sustancias químicas. Sin embargo, otros contaminantes como cobre, amoníaco o hexaclorobenceno tienen mecanismos de inmunotoxicidad independientes del estrés que produce la exposición (Carballo y Muñoz, 1991).

El riesgo derivado de la presencia de contaminantes no sólo radica en su toxicidad para los peces sino también en su influencia sobre el consumidor humano.

1.3. Contaminación.

El concepto de contaminación ha variado considerablemente. En 1983 la FAO aportó esta definición: se entiende por contaminación la "introducción" por el hombre, directa o indirectamente de sustancias o energías en el medio acuático, causando efectos perjudiciales tales como daños a los recursos vivos, peligros para la salud humana, el deterioro de la calidad de agua o la reducción de los atractivos naturales.

No obstante, en la actualidad, y bajo los principios del desarrollo sostenible, se omite la

necesidad de que se produzcan efectos perjudiciales. Por ello, la contaminación podría definirse como cualquier carga adicional de sustancias o energía como resultado de la actividad humana (Lloyd, 1992).

Las causas de esta contaminación hay que buscarlas en la industrialización y el incremento de la población, lo que ha significado un aumento de las sustancias de desecho.

La gran capacidad de autodepuración del agua ha motivado que, tradicionalmente, los cursos de agua hayan sido los lugares más utilizados para desprenderse de los residuos. La capacidad asimiladora de los ríos ha sido desbordada produciéndose el problema de la polución, es decir, la aparición de efectos adversos producidos por niveles de contaminantes capaces de producir efectos patológicos sobre los seres vivos.

Existen multitud de contaminantes ambientales que pueden llegar a afectar a los peces. En este trabajo se han utilizado tres sustancias concretas elegidas como modelo de algunos de los grupos de contaminantes más característicos. En primer lugar, como ejemplo de compuestos inorgánicos metálicos, el cobre. En segundo lugar, como ejemplo de compuestos inorgánicos no metálicos, los nitritos. Por último trataremos, como ejemplo de sustancia orgánica, del xileno de almizcle.

1.3.1. Metales pesados.

Dentro de los contaminantes inorgánicos, los metales pesados son uno de los grupos de mayor importancia para la toxicología ambiental (Hodson, 1988). Entendemos por metales

pesados aquellos elementos del sistema periódico de elevada densidad y pequeño volumen atómico (Babor e Ibarz, 1973). Su importancia radica, entre otras características, en que no se degradan, puesto que son elementos químicos, no compuestos, y permanecen indefinidamente en el medio.

En el agua, estos metales pueden ser absorbidos por los organismos acuáticos penetrando fundamentalmente por el sistema branquial (Hodson, 1988). Tras la absorción estos metales se distribuyen por el organismo, acumulándose en diversos órganos y tejidos. La eliminación es lenta y difícilmente completa (Hellawell, 1988).

En las piscifactorías existe un riesgo evidente relacionado con la contaminación por metales pesados, debido a una serie de factores que vamos a analizar. En primer lugar, las piscifactorías aprovechan los cauces de los ríos, tomando agua de ellos y devolviéndola de nuevo una vez utilizada. Dada la contaminación existente por vertidos a los cursos de agua, existe el riesgo de que este problema se detecte también en los criaderos acuícolas. Además, los sedimentos de los ríos retienen fácilmente los metales, pudiendo éstos liberarse ante cambios del pH, etc.

Por otra parte, la alimentación introduce una serie de metales en el medio acuático. En este sentido, puede existir contaminación de las materias primas o a través de las máquinas de elaboración de los piensos. Además estos alimentos llevan en su composición metales esenciales. Restos de alimentos no ingeridos pueden ceder al agua metales en proporción mayor a la tolerable. Pero el mayor peligro lo constituyen los tratamientos químicos. El sulfato de cobre, por ejemplo, es muy usado en piscifactorías como alguicida, molusquicida

y antiparasitario. La utilización incorrecta de estas sales ha tenido como consecuencia grandes pérdidas en la producción por la aparición de grandes mortandades (Hellawell, 1988). De este modo, en las explotaciones de piscicultura nos encontramos con problemas toxicológicos añadidos a los de las poblaciones naturales.

En función de lo hasta aquí expuesto, podemos concluir que existen tres posibilidades fundamentales por las que un metal pesado puede ocasionar problemas en las piscifactorías: contaminación industrial aguas arriba de la piscifactoría, contaminación asociada a la presencia del metal en el alimento y las excretas, y utilización directa del metal por el piscicultor. Como hemos visto, el cobre, puede aparecer por cualquiera de los tres mecanismos, al ser al mismo tiempo un contaminante industrial, un elemento esencial y agente quimioterapéutico, lo que justifica su elección como modelo en este trabajo.

1.3.2. El cobre.

El cobre se encuentra normalmente en el agua como un metal traza, en concentraciones menores de 5 $\mu\text{g/l}$, aunque por diversas razones esta concentración puede estar aumentada.

La toxicidad del cobre está determinada por la calidad del agua. Así, la toxicidad se incrementa al disminuir la dureza, temperatura y porcentaje de oxígeno disuelto y decrece en presencia de agentes quelantes como EDTA y NTA, ácidos húmicos, aminoácidos y sólidos en suspensión.

El principal factor que afecta a la toxicidad es la dureza (Lloyd, 1992). La diferencia de

toxicidad del cobre en peces en aguas de diferente dureza podría ser dependiente de su complejación con carbonatos (Stiff, 1971).

Se ha sugerido que la máxima concentración de seguridad debería basarse en los percentiles anuales 50 y 95 de cobre soluble de 0.05 y 0.2 respectivamente de la LC50 umbral para trucha arco iris. Este sistema, para distintos valores de dureza, se refleja en la tabla I.

Tabla I. Cobre. Valores de seguridad según la dureza del agua.

Dureza del agua (mg/l de CaCO ₃)	Percentil 50	Percentil 95
10	1.0	5.0
50	6.0	22.0
100	10.0	40.0
300	28.0	112.0

Un incremento en la temperatura puede acortar la supervivencia de peces, sin embargo la CL50 se reduce por la reducción de la temperatura.

Otros factores que afectan a la toxicidad del cobre son la disminución de pH (Lauren y MacDonald, 1986.), La reducción de oxígeno (Lloyd, 1961.) y la alcalinidad (Miller y McKay, 1980; Lauren y Mcdonald, 1986).

Estos efectos de las condiciones de calidad del agua sobre la toxicidad pueden explicarse por la especiación del metal. El término especiación hace referencia a las distintas formas fisicoquímicas en que un metal puede existir en las aguas naturales (Hart y Davies, 1979). La toxicidad de un metal depende indudablemente de su especiación, dado que la biodisponibilidad está influida por la forma química en la que se encuentra.

El cobre puede encontrarse en el agua bajo diferentes formas químicas. La forma más tóxica es el ion Cu^{2+} (Giesy *et al.*, 1986). Por otra parte, el cobre puede unirse a iones carbonato e hidróxido (Pagenkopf *et al.*, 1974) formando compuestos de distinta toxicidad. El cobre presenta gran afinidad por especies químicas orgánicas, lo que facilita su complejación con algunos quelantes tales como EDTA, NTA y ácidos húmicos. La presencia de materia orgánica puede incrementar hasta 3 veces los valores de la tabla I. De este modo, según determinadas condiciones de calidad del agua, como el pH, se pueden dar distintas formas químicas del cobre de distinta biodisponibilidad y, por tanto, toxicidad. La absorción de formas biodisponibles determina, pues, la toxicidad del cobre.

En cuanto al modo de acción del cobre no se conoce bien. La toxicidad se refleja en modificaciones del comportamiento, alteraciones fisiológicas, lesiones en branquias, acúmulo en órganos, alteraciones enzimáticas y hemáticas (Carbonell, 1993).

Dentro del comportamiento, el efecto típico es un incremento en la actividad de los peces. También se ha citado, en trucha arco iris, una pérdida de interés por el alimento (Left *et al.*, 1976) congruente con una disminución en la tasa de crecimiento (Waiwood y Beamish, 1978).

Pasando al segundo aspecto, las alteraciones en la frecuencia respiratoria han sido observadas frecuentemente por la acción del cobre (Drummond *et al.*, 1973; Sellers *et al.*, 1975).

Bilinski y Jonas (1973) encontraron que la exposición de la trucha arco iris a niveles letales de cobre reducía la capacidad de oxidación del lactato. La hipótesis de que la muerte se produce por asfixia es probablemente una simplificación.

En las branquias se producen diversas lesiones: imbibición del epitelio, exceso de producción de mucus con posterior retracción y disolución de los tejidos. (Reichenbach-klinke, 1982). Por último, en la sangre se han citado variaciones del contenido en hemoglobina, cortisol o sodio (Beckman y Zaugg, 1988; Ckyriac *et al.*, 1989).

De estos tres factores, el primero esta ligado a un mecanismo específico de acción del cobre descrito en mamíferos pero no demostrado en el caso de las especies piscícolas; el segundo, corresponde a la respuesta primaria de estrés, que debe esperarse ante cualquier exposición a un tóxico y que, en concreto, ha sido perfectamente descrita en el caso del cobre (Muñoz *et al.*, 1991). En cuanto al tercero, es un mecanismo específico de toxicidad del cobre en peces (Lauren and McDonald, 1986; 1987) ligado a los efectos del metal sobre los flujos de iones a nivel branquial.

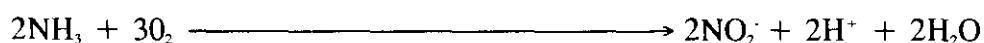
Por consiguiente, tanto los efectos de las condiciones de calidad del agua sobre la toxicidad, como el propio mecanismo de acción están ligados a la interacción del metal con la branquia, y en particular a la cinética del cobre en este órgano, lo que justifica la importancia de los estudios presentados en este trabajo.

1.3.3. Nitritos

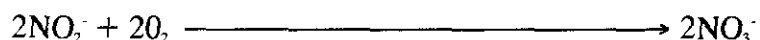
En la piscicultura industrial tienen gran importancia los compuestos nitrogenados, al ser tóxicos y productos principales de excreción del metabolismo de las truchas (Blanco, 1994).

Los nitritos, aunque tóxicos para los peces, no se suelen dar en sistemas acuáticos naturales en concentraciones consideradas tóxicas. En acuicultura, sin embargo, donde las concentraciones de amoníaco puede ser altas, los nitritos tienen mayor probabilidad de alcanzar concentraciones tóxicas. Además, los salmonidos están entre los peces más sensibles a los nitritos (Lewis y Morris, 1986).

Nitritos, amoníaco y nitratos están interrelacionados a través del proceso de nitrificación, la oxidación biológica del amoníaco a nitrato. Bajo condiciones aeróbicas el amoníaco (NH_3) se oxida rápidamente a nitrito (NO_2^-) por la acción bacteriana de las Nitrosomonas, de acuerdo con la siguiente ecuación:



Los nitritos, a su vez, se oxidan a nitrato (NO_3^-) por la acción bacteriana de Nitrobacter

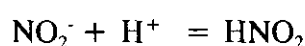


En los sistemas acuáticos bien oxigenados, la conversión de amoníaco a nitrito es el paso limitante del proceso y la conversión de nitrito a nitrato ocurre rápidamente, por eso en la mayoría de los sistemas naturales las concentraciones de nitritos suelen ser bajas (Russo y

Thurston, 1991).

La oxidación de nitrito a nitrato en sistemas de agua recirculada en acuicultura no es tan rápida, causando acumulación de cantidades de nitrito potencialmente tóxicas. Los factores que afectan a la conversión de nitritos son pH, temperatura, oxígeno disuelto, cantidad de bacterias nitrificantes y la presencia de agentes inhibitorios como ácido nitroso y amoníaco.

En solución acuosa se establece el siguiente equilibrio:



Este equilibrio se ve afectado por el pH. A medida que la concentración de H^+ se incrementa, la concentración de nitrito ionizado (NO_2^-) decrecerá, desplazando el equilibrio hacia un incremento en la formación de ácido nitroso (HNO_2).

La causa principal de toxicidad de los nitritos es la oxidación del hierro de la hemoglobina sanguínea a su estado férrico, formándose metahemoglobina, molécula incapaz de unirse al oxígeno, produciendo hipoxia y muerte (Rodríguez-Moreno y Tarazona, 1994).

La presencia de metahemoglobina suele delatarse por el color marrón que confiere a la sangre. Unos niveles elevados de nitritos en el agua, incluso tan bajos como 0.015 mg/l NO_2^- -N provocan niveles elevados de metahemoglobina en sangre de pez (Smith y Williams, 1974). El efecto de la metahemoglobinemia se exagera cuando la demanda de oxígeno es alta (EIFAC, 1984).

La intoxicación por nitritos produce anemia, marcha vacilante y depósito de pigmento hemático en hígado, bazo y riñones (Reichenbach-Klinke, 1982). Los nitritos también han sido citados como implicados en la formación de compuestos de nitrógeno nitroso (Archer *et al.*, 1971).

Resulta imposible ofrecer un valor único como nivel de toxicidad aguda de los nitritos en peces, ya que el rango de concentraciones tóxicas (por ejemplo, CL_{50} o concentraciones letales umbrales) es muy amplio. Los dos factores fundamentales que explican esta enorme dispersión son la diferencia en susceptibilidad de las diferentes especies de peces, y para cada especie, la influencia de las condiciones de calidad del agua sobre la toxicidad de los nitritos.

Los principales factores que afectan a la toxicidad de los nitritos son el pH, cloruros y calcio. Un incremento del pH implica una disminución de NO_2-N y un aumento de HNO_2-N . Esta modificación en la especiación está ligada a fluctuaciones en la toxicidad. No obstante, de todos los parámetros mencionados, el que produce mayores variaciones es la concentración de cloruros en el agua.

La toxicidad de los nitritos para trucha arco iris decrece cuando se incrementan las concentraciones del ion cloruro (Brown, 1993), lo que ha sido citado para otras especies. Es evidente que la absorción de nitritos está relacionada con la de cloruros. Se ha visto que branquias de trucha arco iris expuestas a nitritos tenían mayor número de células del cloruro sugiriendo una respuesta para mantener los niveles fisiológicos de cloruro en presencia de nitritos (Gaino *et al.*, 1984). La explicación de este efecto es la siguiente. El ion nitrito es absorbido por la branquia utilizando el mecanismo de absorción del ion cloruro en un proceso

competitivo entre ambos iones. Por lo tanto la influencia de la concentración de cloruro en el agua sobre la toxicidad de los nitritos es tan directa que pueden establecerse relaciones lineales entre la toxicidad de los nitritos (expresada como CL_{50}) y la concentración de cloruro en el agua (Gaino *et al.*, 1984).

La toxicidad, por tanto, depende de la cinética del compuesto en el animal. En consecuencia, es necesario conocer la toxicocinética de los nitritos para comprender y preveer su acción tóxica sobre las especies de cultivo. La existencia de relaciones cuantitativas permitirá extrapolar los resultados a las condiciones particulares de cada explotación.

1.3.4. Xileno de almizcle

El xileno de almizcle ha sido utilizado en esta tesis como ejemplo de un compuesto orgánico que, sin ser tóxico, puede tener una importancia comercial por su bioacumulación en las truchas, y el peligro potencial para el consumidor humano.

Los almizcles son sustancias que se utilizan para fijar los perfumes. Se obtienen de plantas y animales o por síntesis química. Los almizcles naturales son cetonas o lactonas macrocíclicas con un anillo de aproximadamente quince carbonos (Merck Index, 1989).

El xileno de almizcle es una sustancia sintética nitroaromática muy usado en la industria cosmética, en jabones y cremas. El consumo mundial de almizcle, sólo en detergentes, puede rondar las mil toneladas por año. Esto hace que acabe por aparecer en el medio, de hecho ya se ha encontrado en muestras de aguas y peces. Tiene un alto poder de bioconcentración

y una distribución ubicua (Yamasagishi *et al.*, 1983; Rimkus y Wolf, 1995).

La toxicidad aguda es baja pero se ha citado como posible carcinógeno. También induce la actividad de algunas enzimas (Helbling *et al.*, 1994). Este hecho, unido a que se ha detectado en leche humana y grasa corporal ha levantado la alarma sobre las posibles rutas de exposición del ser humano.

El xileno de almizcle tiene un alto potencial como contaminante ambiental debido a su estabilidad ante la degradación química y biológica y su alta lipofilia. Es esta última característica la que le confiere la capacidad de bioacumulación, aunque algunos autores afirman que, en el caso de las truchas, ésta no es tan grande como permitiría predecir su lipofilicidad (Boleas *et al.*, 1995).

En un estudio de distribución en trucha arco iris, las concentraciones más altas se encontraron en intestino y las más bajas en músculo y branquias (Fernández *et al.*, 1995).

El problema de su acumulación, debe ser estudiado desde el punto de vista cinético, sin embargo, los escasos estudios *in vivo* han sido ineficaces, debido a su lenta eliminación.

Los conocimientos sobre toxicocinética son muy limitados. Dada su baja toxicidad para peces podría acumularse en estos inadvertidamente con los consiguientes riesgos para la salud humana.

Tanto la acumulación, como la posible eliminación son procesos toxicocinéticos que deben ser estudiados para poder dar una solución a los problemas que estos compuestos pueden

causar sobre el consumo humano.

1.4. Toxicocinética.

Como hemos visto en los apartados anteriores, existen muchos compuestos para los cuales el factor fundamental que regula su toxicidad, y, por tanto, la aparición de problemas en las piscifactorías, es su cinética, y, en particular, su absorción y/o eliminación por las branquias.

La toxicocinética puede definirse como el estudio cuantitativo de los procesos que experimenta, en función del tiempo, una sustancia tóxica en un organismo (Repetto, 1988).

El término "toxicocinética" no es más que una adaptación al terreno de la toxicología de "farmacocinética" acuñado por F. H. Dost que la definió como "la ciencia del análisis cuantitativo entre organismo y medicamento" (Wagner, 1983). Su objetivo es estudiar el tránsito de los medicamentos en el organismo en función del tiempo y sus cantidades en el cuerpo y en la excreta, así como elaborar modelos cinéticos aplicables a la interpretación de los datos obtenidos.

La farmacocinética ha sido definida como la ciencia matemático-biológica que estudia la velocidad de los procesos de LADME (siglas de "liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción") y sus repercusiones en la concentración de los compartimentos que se consideran en medicamento y metabolitos (Pla y Pozo, 1974). La Farmacocinética relaciona matemáticamente concentraciones y velocidades y permite representar gráficamente el curso de los medicamentos en sus formas de dosificación, en el organismo, en los lugares

de absorción y en los emunctorios en función del tiempo. Para ello utiliza modelos cinéticos sencillos pero adecuados (Pla y Pozo, 1974).

La aplicación de la ciencia y técnica de la cinética química al comportamiento químico en los sistemas biológicos permite caracterizar matemáticamente los procesos de absorción, distribución y eliminación. La caracterización matemática de esos procesos permite hacer una predicción cuantitativa de cantidades y concentraciones de una sustancia química en el cuerpo en función del tiempo y del régimen de administración. El valor de la farmacocinética en el campo de la toxicología acuática se ha incrementado pero aún hay poca información (Barron *et al.*, 1990).

Existen diferentes modelos farmacocinéticos, de los que mencionaremos los compartimentales, no compartimentales y fisiológicos.

1.4.1. Modelos compartimentales.

Un modelo compartimental es una descripción matemática simplificada del comportamiento de una sustancia en un animal, donde el cuerpo está representado por un sistema de compartimentos. Un compartimento no representa necesariamente órganos o tejidos específicos, más bien representa grupos de tejidos que son cinéticamente indistinguibles para una sustancia determinada. Los compartimentos del modelo normalmente no tienen una fisiología o anatomía real. Ellos simplemente caracterizan la dinámica de una sustancia. El tamaño del compartimento está caracterizado por el volumen de distribución aparente.

Desde el punto de vista farmacocinético se considera dividido el organismo en compartimentos, que son sectores hipotéticos en los que el fármaco se considera distribuido en él uniformemente.

El número de compartimentos en que conviene dividir el organismo depende de la naturaleza del fármaco objeto de estudio. Si éste no presenta afinidad por ningún elemento orgánico en particular y se distribuye instantáneamente por toda el agua corporal se utilizará un modelo de distribución monocompartimental. Si el fármaco no se distribuye instantáneamente o lo hace de un modo heterogéneo convendrá dividir el organismo en dos o más compartimentos (Pla y Pozo, 1974).

Las dos asunciones primarias de un modelo compartimental son distribución instantánea y distribución lineal. Distribución instantánea significa que una vez que la sustancia entra en un compartimento, se distribuye instantáneamente dentro de él. La distribución lineal significa que la concentración de la sustancia en cada tejido asociado con un compartimento es directamente proporcional a la cantidad de sustancia en el compartimento. Mientras diferentes tejidos pueden tener diferentes concentraciones de la sustancia, un cambio en la concentración en un tejido será acompañada por un cambio proporcional en la concentración de todos los demás tejidos dentro del compartimento. Esta asunción permite el uso de un tejido como referencia, de tal modo que la dinámica del xenobiótico en el tejido de referencia será proporcional a su dinámica en el compartimento.

Los modelos farmacocinéticos usan generalmente sangre o plasma como tejido de referencia por su fácil recolección y su contacto ubicuo con todos los demás tejidos. Se puede analizar

el cuerpo entero lo que permite una medida de todos los compartimentos y no sólo del tejido de referencia.

Generalmente, se asume una cinética de primer orden en los modelos compartimentales (cinética lineal). La tasa de transferencia de una sustancia desde o hacia un compartimento es directamente proporcional a la concentración en el compartimento. La asunción de una cinética de primer orden es implícita en el modelo a no ser que un proceso no-lineal se incorpore explícitamente. Aunque la asunción de una cinética de primer orden es normalmente una buena aproximación de la mayoría de los procesos de transferencia, la asunción puede ser verificada experimentalmente determinando los parámetros del modelo a dos diferentes dosis, diferentes en al menos un factor de 5. Cuando los procesos cinéticos son de primer orden, los datos de concentración-tiempo pueden ser superpuestos normalizándolos para la dosis (principio de superposición). Cinéticas no lineales pueden ser incorporados en el modelo si los procesos no lineales pueden ser caracterizados experimentalmente.

El modelo monocompartimental fue el primero en desarrollarse. Considera al organismo como un compartimento único constituido por el agua plasmática, el agua intersticial y el agua intracelular. El fármaco se supone distribuido uniformemente, de tal modo que la concentración plasmática es la misma que existe en todo el compartimento. El equilibrio de concentraciones del fármaco entre plasma, fluido intersticial y agua intracelular es instantáneo.

Como se trata de un sólo compartimento homogéneo, existe un proceso de entrada y un

proceso de salida de ese único compartimento: agrupa los procesos de liberación y absorción en uno sólo (incorporación o absorción). Asimismo agrupa el metabolismo y excreción en un proceso único (eliminación). Ambos procesos (absorción y eliminación) se consideran constantes.

Frente a este modelo se pueden hacer una serie de críticas:

- No existe ninguna sustancia que se distribuya instantánea y uniformemente en el organismo.
- Por el distinto aporte sanguíneo que reciben los tejidos, existiendo zonas más vascularizadas que otras, habrá sectores a los que el fármaco acudirá antes y otros a los que tardará más en llegar (e irse). Así, las zonas más accesibles formarían un compartimento central, donde se producirían los principales procesos de biotransformación y excreción y donde la distribución sería prácticamente instantánea. Habría también un compartimento periférico en el cual no sucederían esos procesos, donde el fármaco estaría depositado de forma pasiva y su eliminación hacia el plasma dependería del grado de eliminación en el compartimento central.
- Por la propia heterogeneidad de los tejidos, se prevé una afinidad distinta por los medicamentos.

No obstante, la importancia relativa en la práctica de cada uno de estos problemas depende de las características del compuesto y del sistema biológico, por lo que son los datos experimentales los que deben condicionar la utilización de modelos monocompartimentales o de modelos multicompartimentales, entre los que los bi y tricompartimentales son los más empleados.

1.4.2. Modelos no compartimentales

El modelo no compartimental usado en farmacocinética está basado en la teoría del momento estadístico. Se ha usado de forma limitada en toxicología acuática pero cada vez se utiliza más en farmacología y toxicología de mamíferos. La aplicación del momento estadístico en farmacocinética se desarrolla del concepto de que la eliminación de una sustancia es un proceso estocástico y que el tiempo de residencia de la sustancia en un animal es una función de los tiempos de residencia individuales de cada molécula.

La teoría de los momentos estadísticos, aplicada desde 1956 en otras áreas de la ciencia como en ingeniería química y en cromatografía, ha sido aplicada en farmacocinética para el cálculo de los parámetros de absorción, distribución y eliminación.

Para solventar los defectos de los modelos compartimentales se aplicó la teoría de los momentos estadísticos que muestra mediante integración simple los parámetros que definen la evolución de la curva concentración-tiempo.

Esta teoría se basa en considerar la curva de concentración-tiempo como una distribución estadística cuyos momentos se definen de la siguiente manera

1.4.3. Modelos fisiológicos

Se parte de la idea de que los parámetros estimados por modelos compartimentales pueden tener poca relación con la anatomía o fisiología del animal. Un modelo farmacocinético

fisiológico pretende dar una descripción más realista, incorporando los procesos fisiológicos que tienen lugar.

Requiere, por tanto, información detallada acerca del pez y de las propiedades del fármaco: anatómicas (volúmenes de tejidos), termodinámicas (coeficientes de partición entre sangre y tejidos), fisiológicas (perfusión de los distintos tejidos, biotransformación). La mayor ventaja es que, una vez que los principales mecanismos están caracterizados, se puede extrapolar el modelo a otras condiciones y especies distintas. Estos modelos se han usado mucho en mamíferos y en peces para el rojo fenol y el metotrexate.

Los modelos fisiológicos usan un balance de masa, agrupando tejidos según sus diferencias de perfusión.

Para desarrollar estos modelos es necesario estimar el coeficiente de partición sangre/tejido para todos los tejidos que se incluyen en el modelo. En peces, es necesario usar peces grandes pues se necesitan datos de concentración-tiempo. En trucha se conocen muchos datos de la fisiología como para poder desarrollar estos modelos.

1.5. Enfermedades infecciosas.

La trucha, del mismo modo que otras especies, está expuesta a padecer una serie de enfermedades infecciosas que provocan grandes mortandades en las poblaciones.

Por otra parte, los sistemas fisiológicos de los organismos acuáticos se ven influidos por los

cambios que se produzcan en la calidad del agua. Son especialmente vulnerables el sistema de osmorregulación y el sistema respiratorio. Estas alteraciones en la calidad de agua son responsables de la aparición de estrés, lo que puede tener como consecuencia un proceso patológico (Parker, 1986). En este sentido, muchos estudios revelan la relación entre exposición de los peces a contaminantes y aparición de enfermedades (Brucke, 1991).

Así, la relación entre calidad del agua y enfermedad infecciosa puede ser debida a una acción directa del contaminante o a la situación de estrés inespecífica que provocan los tóxicos.

Por otra parte este estrés puede medirse de diversas maneras e incluso, en condiciones de cría intensiva, por la eficiencia en la conversión del alimento (Smart, 1981), es decir: tiene una influencia clara en la producción.

Hay dos infecciones de una gran importancia en acuicultura: la producida por *Yersinia ruckeri*, denominada "boca roja" y la llamada enfermedad bacteriana del riñón, BKD, producida por *Renibacterium salmoninarum*.

1.5.1. *Yersinia ruckeri*

Es el agente productor de la enfermedad de la boca roja (ERM -Enteric Red Mouth).

Esta enfermedad se empieza a conocer en la década de los cincuenta. Hasta hace unos años la ERM estaba restringida a los salmónidos y a los EEUU. A partir de los setenta se registran casos en Australia y Europa. Se ha encontrado en la mayoría de las áreas en que se cultiva trucha arco iris (Brown, 1993). En España, el primer aislamiento del germen fue

en 1985 (De la Cruz *et al.*, 1985) y desde entonces ha causado grandes pérdidas económicas. Afecta principalmente a salmónidos aunque también se han dado casos en no salmónidos como carpas.

Actualmente se reconocen dos biotipos de bacterias: biotipo I (sorbitol negativas) que son las más patógenas, correspondiéndose al serotipo 01 y biotipo II (sorbitol positivas) que reúne 5 serotipos (CAICYT, 1988).

La sintomatología incluye inflamación y erosión de las mandíbulas y el paladar, hemorragia subcutánea en boca y garganta, aunque esta última lesión, que le ha dado el nombre a la enfermedad, no es patognomónica, ya que a veces no existe la boca roja (Brown, 1993). Puede presentarse obscurecimiento de la piel, hemorragias en la base de las aletas, exoftalmia bilateral y tendencia al aletargamiento.

Entre las lesiones internas posibles están la hipertrofia del bazo y hemorragias en el músculo e intestino, donde se acumula un fluido amarillo. Se han descrito desde la forma hiperaguda a la crónica.

El diagnóstico se basa en el aislamiento e identificación del agente causal a partir del riñón en placas de TSA, incubadas a 20-25 °C durante 24-48 h.

Las colonias de *Y. ruckeri* son regulares, abultadas, blancas, de 2-3 mm de diámetro. El microorganismo es un bacilo gram negativo, móvil, oxidasa negativo, que fermenta la glucosa sin producción de gas. Se diferencia de *Edwardsiella tarda* por ser indol negativa y

por la presencia de gelatinasa. Se han empleado métodos de detección rápida como el API-20E, que permiten incluso distinguir los biotipos por la reacción del sorbitol.

Se han utilizado también métodos serológicos. Recientemente se han obtenido anticuerpos monoclonales para utilizarlos en inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y ELISA (Vallejos *et al.*, 1995).

Se discute si hay portadores asintomáticos que actúan como reservorios. Se necesita que exista un estrés para que los portadores sean capaces de transmitir la bacteria (Austin y Austin, 1987). Algunos autores consideran a la bacteria como saprófita (Rucker, 1966). Otros consideran que es parte de la flora normal de las branquias (Brown, 1993).

Existen varias vacunas en el mercado pero, paradójicamente, no se conoce como son captadas por el pez ni el exacto mecanismo de acción (Austin y Austin, 1987).

1.5.2. *Renibacterium salmoninarum*

Produce la enfermedad bacteriana del riñón (BKD). Fue descrita por vez primera en los años treinta en el salmón atlántico en Escocia. Posteriormente se ha dado en un gran número de países. La infección es crónica y sistémica, limitada a las distintas especies de salmónidos.

La enfermedad se caracteriza por un hinchamiento y desorganización del riñón, con abscesos blanco-grisáceos, los cuales pueden presentarse también en hígado y bazo. En peces de mayor edad puede acumularse líquido ascítico en la cavidad abdominal. Externamente los

peces pueden presentar exoftalmia, lesiones en los ojos, abdomen hinchado y úlceras (Austin y Austin, 1987).

El diagnóstico presuntivo se realiza por observación al microscopio de frotis teñidos de riñón. Son bacilos cortos gram-positivos que están localizados tanto intra como extracelularmente. El diagnóstico confirmativo debe realizarse por inmunofluorescencia directa o indirecta.

Para el aislamiento del agente causal deben utilizarse medios específicos para *Renibacterium* como KDM-2, SKDM y KDMC-C. La incubación en estos medios se realiza a 15-20 °C durante 20-30 días. Se han descrito otras pruebas como ELISA o inmunofluorescencia aunque son menos sensibles ante reducida carga microbiana (White *et al.*, 1995). Sin embargo, otros autores apuestan por el ELISA (Gudmundsdottir *et al.*, 1993). Recientemente se ha puesto a punto una técnica de PCR para detectar la bacteria en huevos y líquido ovárico (Høie, 1995), tejido infectado y huevos (Figueroa *et al.*, 1995)

R. salmoninarum es un bacilo corto, gram-positivo, oxidasa negativo y catalasa positivo. No móvil, sin cápsula ni endosporas. Aerobio. Crecimiento entre 5 y 22 °C, siendo su temperatura óptima 15 °C. Esta bacteria es incapaz de utilizar la mayoría de los azúcares y no produce gelatinasa ni amilasa.

La BKD no es una enfermedad oportunista causada por un organismo ampliamente diseminado en el medio ambiente acuático. Sin embargo el microorganismo puede resistir unos limitados períodos en el medio, al menos lo suficiente para asegurar una transmisión

horizontal entre peces en el mismo acuario (Evenden *et al.*, 1993).

El modo principal de transmisión es por contacto pez-pez, a través de las heces o ingestión de vísceras infectadas. Como típico patógeno obligado el reservorio debe estar formado por peces enfermos o portadores asintomáticos (Austin y Austin, 1987) de hecho se ha encontrado en *Salvelinus fontinalis* (Starliper y Teska, 1995). Se piensa también que puedan transmitirlo peces en libertad, como salmones (Roberts y Shepherd, 1986). También juega un papel fundamental en la diseminación la transmisión vertical.

La manifestación de la enfermedad está asociada a ciertos factores ambientales como temperatura, salinidad, dureza del agua y dieta. Aparece característicamente al final del invierno y primavera.

La supervivencia depende de la habilidad del patógeno para sobrevivir y multiplicarse dentro de las células fagocíticas del hospedador. Es importante escapar de la vacuola fagocítica y quedar libres en el citoplasma. Al parecer *R. Salmoninarum* posee un factor dañante de membrana. Se ha demostrado que la incapacidad de los macrófagos para matar *R. Salmoninarum* no es totalmente debida a la inhibición de la actividad bactericida del macrófago. Al parecer, la localización intracelular de *R. salmoninarum* proporciona un ambiente de protección para el patógeno y un estímulo constante del sistema inmunitario del hospedador que responde pero de una manera inadecuada (Evenden *et al.*, 1993).

La BKD se considera una de las enfermedades bacterianas más difíciles de combatir. La eritromicina aparece como el quimioterápico más eficaz, si bien no elimina por completo al

patógeno y es muy costosa. La desinfección de la superficie de los huevos con yodóforos reduce la incidencia de la enfermedad, pero no la elimina totalmente al transmitirse también *Renibacterium* dentro del huevo (CAICYT, 1988).

En cuanto a la inmunización, los favorables resultados descritos por algunos investigadores no han sido confirmados por otros. Las vacunas son orales, intraperitoneales, o por inmersión con o sin coadyuvante (Evenden et al., 1993). La capacidad protectora de las vacunas es cuestionable (Austin y Austin, 1987).

1.6. Métodos alternativos *in vitro*

El pez constituye un sujeto ideal en lo referente a contaminación del agua. Sin embargo, los estudios farmacocinéticos en peces presentan dificultades experimentales mucho mayores que en mamíferos o animales terrestres en general. Los problemas comienzan al intentar mantener unos parámetros ambientales bajo control: temperatura del agua, salinidad, dureza, oxígeno, densidad de población, alimentación y manejo pueden afectar a los datos. Además influyen factores endógenos como tamaño y estado fisiológico (esmolificación, sexo, madurez sexual, salud). No hay que olvidar que los procedimientos experimentales pueden alterar las condiciones del pez: la anestesia, la toma de muestras, etc. Las tomas repetidas de muestras de sangre de un mismo individuo son muy difíciles de llevar a cabo, haciendo necesario tomar muestras de distintos individuos, introduciéndose por ello un factor de variación individual. De este modo, la extrapolación de los datos para otras condiciones es difícil.

Es necesario, por tanto, encontrar métodos alternativos *in vitro* para estudiar la fisiología de

los peces, en lo relativo a su relación con el medio externo. Este ánimo ha llevado a investigar sistemas *in vitro*, incluyendo órganos aislados, para desarrollar en peces, igual que han sido desarrollados para otros vertebrados. Así se han desarrollado para diferentes órganos, como la preparación relativamente reciente de corazón de trucha (Farrell *et al.*, 1989). No obstante y por razones que comentaremos a continuación, las preparaciones más importantes y extendidas son las relacionadas con las branquias.

1.7. La branquia como sistema fundamental

La branquia es un órgano multifuncional especializado en funciones como el intercambio respiratorio, la osmorregulación, la eliminación de productos de desecho del metabolismo del nitrógeno y la regulación del equilibrio ácido-base (Girard y Payan, 1980). Posee una gran área irrigada lo que junto a una corta distancia entre sangre y agua les facilita esos intercambios. Esto implica que las branquias son la principal vía de absorción de compuestos en disolución (Pärt y Svanberg, 1981).

En cuanto a la estructura, las branquias de un teleósteo típico comprenden dos series de cuatro holobranquias que forman las paredes de la faringe. Cada holobranquia se compone de dos hemibranquias que se prolongan desde el borde posterior del arco branquial. Las hemibranquias están formadas por una fila de laminillas primarias. Sobre toda la superficie dorsal y ventral de cada laminilla primaria se disponen las laminillas secundarias. Los arcos contienen arterias branquiales aferentes que provienen de la aorta ventral y arterias branquiales eferentes que desembocan en la aorta dorsal.

En la branquia se pueden distinguir dos tipos de epitelio de acuerdo a su irrigación sanguínea y sus características celulares:

- El epitelio de la laminilla primaria, que contiene en su mayoría células del cloruro y está conectado a la circulación venosa (parte de la arteria lamelar primaria, incluye el seno venoso central de la laminilla primaria y está conectado al sistema venoso branquial).
- El epitelio de la laminilla secundaria, de células respiratorias e irrigado por circulación arterial (parte de la arteria lamelar aferente y va a dar a la arteria lamelar eferente).

Las células respiratorias representan el 96 % de la superficie epitelial. El resto son las células del cloruro y las productoras de mucus.

Los peces obtienen el oxígeno de la pequeña cantidad que está disuelta en el agua. Para extraer este oxígeno eficientemente, la estructura branquial consiste en un fino tamiz a través del cual el agua es bombeado. Las laminillas están superpuestas unas a otras formando un tupido filtro. (Lloyd, 1992). Durante la respiración el agua pasa a través de la boca hacia las branquias y sale por los opérculos. Una corriente continua de agua se mantiene gracias a movimientos de compresión y expansión de las cavidades bucal y opercular. La sangre circula en las laminillas secundarias en el sentido opuesto al del flujo del agua, con un rendimiento de la extracción de oxígeno de hasta el 80% (Roberts, 1981).

El intercambio gaseoso tiene lugar por simple difusión, facilitado por una gran superficie ($300 \text{ cm}^2/100 \text{ g}$ para la trucha arco iris), cortas distancias de difusión ($2\text{-}10 \mu\text{m}$) y por un movimiento de sangre y agua a contracorriente (Pärt, 1989a). La estructura de las laminillas secundarias consiste en una fina capa de células epiteliales hacia el exterior y espacios por

los que fluye la sangre hacia el interior. Así, el oxígeno disuelto en el agua tienen que recorrer una corta distancia para llegar al torrente sanguíneo (Lloyd, 1992).

Los peces, a diferencia de los organismos terrestres, tienen que mantener un equilibrio osmótico con el agua en que viven. Por simple ósmosis el agua entra dentro del cuerpo. Este agua es filtrado de la sangre por los riñones pero, como en los peces no hay reabsorción de agua se produce un copioso flujo de orina. Los riñones reabsorben bastante del sodio y cloruro de la orina para prevenir una pérdida de sal, ya que ésta abandona el cuerpo también a través de la piel. Esta pérdida es restituida por la absorción activa de esos elementos en las branquias, donde el sodio se cambia por hidrógeno y el cloruro por bicarbonato. De hecho la mayor regulación del equilibrio de sales la llevan a cabo las branquias y no el riñón (Lloyd, 1992).

En el intercambio iónico, los diversos grupos celulares desempeñan distintas funciones. Las células del cloruro tienen un importante papel en la adaptación de los peces a agua salada, presentando una serie de cambios morfológicos durante este proceso. El intercambio $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ se produce en las células respiratorias, interviniendo también en el equilibrio ácido-base y en la excreción. No obstante, las células del cloruro podrían intervenir en la eliminación de ciertas sustancias orgánicas (Girard y Payan, 1980).

En los teleósteos, la piel, intestino y branquias están en contacto directo con el agua externa y podrían ser consideradas lugares potenciales de absorción de sustancias. Sin embargo la piel es casi impermeable y, al menos, los peces de agua dulce, no beben agua, siendo estas vías de menor importancia en la absorción.

Las sustancias disueltas pueden entrar en el epitelio por dos vías, a través de las células (transcelular) o entre las células, por sus uniones (paracelular). Las branquias de peces de agua dulce tienen un epitelio con unas uniones muy apretadas lo que sugiere que la vía de penetración es transcelular.

Las sustancias en el agua pueden ser absorbidas por las branquias, pasar al torrente circulatorio y circular por el cuerpo. Si las concentraciones del tóxico son suficientemente altas, las delicadas células de la laminilla secundaria pueden ser dañadas afectando a las funciones de respiración y regulación de sales. Las branquias son una ruta de principal importancia para la captación de sustancias tóxicas por los peces, y en la mayoría de los casos, la ingestión de esas sustancias con el alimento tiene mucha menor importancia (Lloyd, 1992). Tanto los compuestos orgánicos hidrofóbicos como los hidrofílicos y los iones metálicos entran en el pez a través de las branquias; por ello, los estudios sobre la biodisponibilidad de las sustancias deberían centrarse en este órgano.

El mecanismo de absorción es el que determina si una determinada sustancia química estará disponible. La tasa de absorción podría usarse para estimar la biodisponibilidad (Pärt, 1990).

1.8. La perfusión de branquias.

Desde principios de siglo se han venido desarrollando preparaciones de branquias para estudiar la fisiología branquial (Perry *et al.*, 1984a).

Las preparaciones de perfusión branquial permiten medir muchas variables de la

funcionalidad branquial. El control de la composición del líquido, la presión y el flujo y la exclusión de la circulación postbranquial, junto con una elevada precisión de las medidas, son las principales ventajas. Pero la compleja estructura de las branquias y su variedad de funciones pueden llevar a conclusiones erróneas. Además, la perfusión y el aislamiento introducen nuevas variables como los efectos del anestésico, deformaciones mecánicas y estrés, y la muerte gradual de los tejidos. El principal criterio para juzgar una preparación es su habilidad para reproducir el comportamiento fisiológico del tejido en animales intactos. Las dificultades existentes para obtener información sobre la función branquial in vivo impide realizar una comparación entre ambos métodos. De hecho, esa es la razón para desarrollar preparaciones in vitro. (*Perry et al.*, 1984a).

1.8.1. Tipos de preparaciones.

Las preparaciones pueden ser de cuatro tipos: arcos branquiales aislados, cestas branquiales incluyendo todos los arcos, cabezas y cuerpos enteros.

Los arcos branquiales aislados han sido utilizados por muchos investigadores (Ellis and Smith, 1983). La preparación consiste en un arco branquial separado perfundido por la arteria branquial aferente, recogiendo el perfusado por un catéter en la arteria branquial eferente.

Las cestas branquiales perfundidas fueron utilizadas por los primeros investigadores (Reite, 1969). Suponen la canulación del bulbo arterioso y el corte de los arcos cerca del techo de la boca.

Las preparaciones de branquias en cabeza aislada se han utilizado ampliamente en los experimentos de fisiología branquial. Las cabezas tienen una cánula de entrada en la aorta ventral o bulbo arterioso y una cánula de salida en la aorta dorsal.

Las preparaciones de cuerpo entero son iguales a las de cabeza aislada pero sin el catéter oclusivo en la aorta dorsal. En lugar de ello se utiliza una cánula no oclusiva para toma de muestras y medidas de la presión.

1.8.2. Preparación de branquias en cabeza aislada

La perfusión de cabeza ha sido muy utilizada en experimentos sobre la fisiología branquial (Pärt y Svanberg, 1981; Pärt *et al.*, 1984; Gardaire *et al.*, 1985; Pärt *et al.*, 1985; Andersson y Pärt, 1989; Avella y Bornancin, 1989; Block *et al.*, 1991; etc).

El método de perfusión más empleado está representado en la Figura 2. Este método incluye un depósito de suero a una altura superior a la preparación y una bomba cardiaca que impulsa regularmente el líquido de perfusión. A flujo constante, cambios en la presión a través de las branquias indican alteraciones en la resistencia vascular.

Las cabezas tienen la entrada en la aorta ventral o bulbo arterioso y una cánula de salida en la aorta dorsal a la altura del opérculo caudal. La ventilación se mantiene artificialmente aunque algunas preparaciones ventilan espontáneamente.

En una preparación típica, el 80 % del output cardiaco se recoge de la aorta dorsal mientras

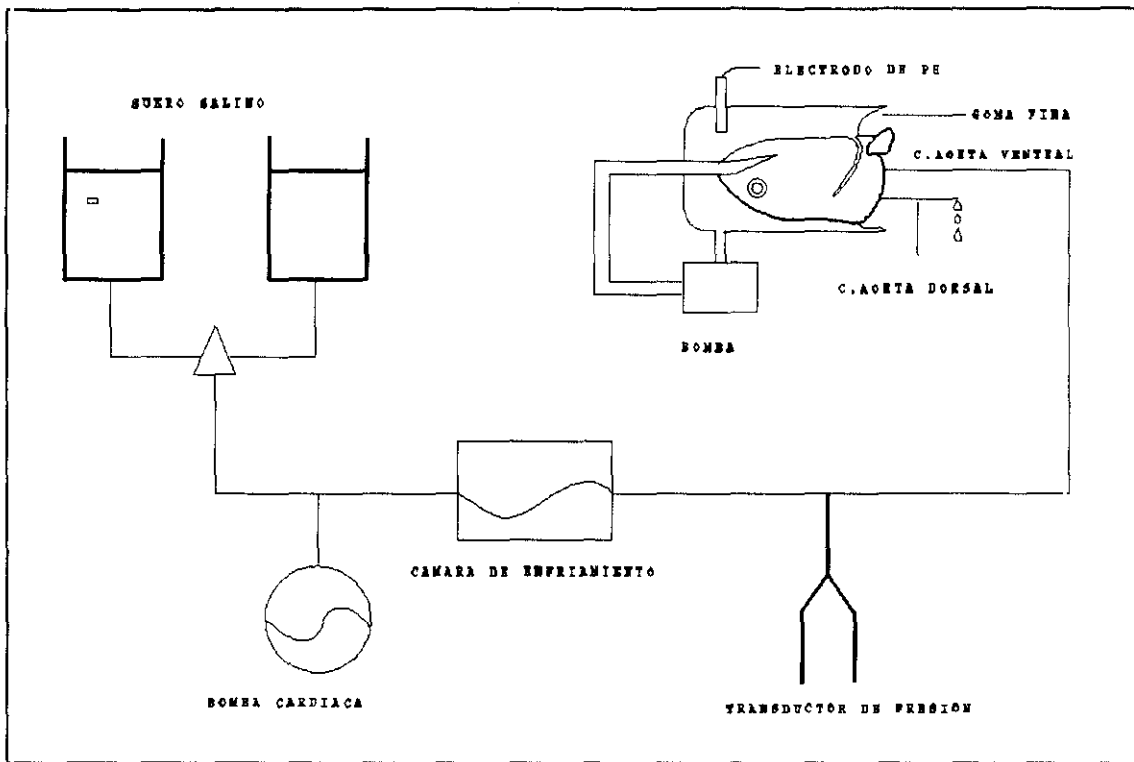


Figura 2. Esquema de la preparación de branquias en cabeza aislada.

que el resto se lo lleva el flujo venoso. El flujo venoso se asume que está en contacto con las células del cloruro que están involucradas en el transporte iónico, por lo que se ha dicho que la circulación venosa tienen una función ion-reguladora.

La utilización de sustancias radioactivas se ha generalizado por su facilidad y sensibilidad en el análisis. Sin embargo, para ciertos compuestos, como algunos orgánicos, la cromatografía presenta ventajas, al no confundir los metabolitos con la molécula original.

1.8.3. Medida de la viabilidad de la técnica

Las preparaciones de branquias están limitadas por su deterioro natural. La viabilidad de la preparación se evalúa por tres métodos:

- Presión de perfusión aferente
- Flujo neto de sodio
- Examen histológico

Una preparación viable se caracteriza por una presión estable. Un incremento de la presión es un signo de vasoconstricción en el circulatorio. Ese incremento va acompañado por la formación de edema en la laminilla secundaria, produciéndose un incremento de las distancias de difusión entre sangre y agua. el resultado es una reducción en la capacidad de difusión (Pärt *et al.*, 1982). La presencia de adrenalina en el líquido de perfusión previene la vasoconstricción.

Una preparación viable se caracteriza por una concentración de Na^+ estable o ligeramente a la baja en el agua. Es un indicador de viabilidad muy sensible porque la absorción contra gradiente requiere energía metabólica. Las branquias con edema poseen un flujo negativo de sodio, mostrando como pierden este ion.

1.8.4. Estudios realizados

Las preparaciones *in vitro* de branquias han sido ampliamente utilizadas para estudiar la fisiología branquial. Desde Krakow (1913) se han usado estas preparaciones permitiendo controlar y medir muchas variables de la funcionalidad branquial.

Uno de los temas fundamentales de investigación ha sido el intercambio iónico en la branquia. Así, esta técnica se ha utilizado para examinar el mecanismo de la excrección de

amoniaco y la absorción de sodio. Primeramente Payan y colaboradores (1975) estudiaron la bomba de sodio en la preparación de perfusión branquial, comprobando que la entrada de sodio era similar a la de peces *in vivo*. También abordaron la excreción de amoniaco en dicha preparación, comprobando el efecto de varias sustancias. De este modo vieron como la adrenalina estimulaba la entrada de sodio y la excreción de amoniaco. La acetazolamida reducía la entrada de sodio y la excreción de amoniaco, sin alterar la salida de sodio. Se empezó entonces a postular un intercambio normal en la branquia $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$.

Posteriormente se estudió el efecto de la temperatura y CO_2 sobre la excreción de amoniaco. Un cambio brusco de temperatura reducía la permeabilidad de la branquia al amoniaco mientras que la presencia de CO_2 activaba la excreción (Payan y Matty, 1975). Payan (1978) mostró nuevas evidencias de un intercambio $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ en la branquia de trucha, ofreciendo un modelo en el que el sodio entraba gracias a la Na^+/K^+ ATPasa y el amoniaco atravesaba la membrana en dirección contraria, en su forma no ionizada.

Sin embargo, otros autores (Avella y Bornancin, 1989) han rechazado el intercambio sodio/amoniaco, vinculando la absorción de sodio a la excreción de iones H^+ .

Girard y Payan (1980) estudiaron las diferencias en agua dulce y agua salada y la participación de los distintos tipos celulares (células respiratorias y células del cloruro) en la absorción branquial de sodio. Esta línea ha sido seguida por otros autores (Gardaire *et al.*, 1985) que demostraron que las células del cloruro de la primera laminilla contribuyen en un 20 % a la misma. La absorción de cloruro está relacionada con la concentración de HCO_3^- y CO_2 (Perry *et al.*, 1984b) y está controlada adrenérgicamente, aumentada por la estimulación del receptor alfa e inhibida por la estimulación del receptor beta (Perry *et al.*,

1984c).

Perry y colaboradores (1985) compararon el transporte iónico en la preparación de perfusión branquial usando suero Ringer y sangre como líquido de perfusión, analizando Cl^- , Na^+ y NH_4^+ . La absorción de sodio se deterioró más rápidamente en la perfusión con Ringer, mientras la de Cl^- se mantuvo relativamente estable. La excreción de amoníaco fue similar con ambos líquidos de perfusión.

Muchos estudios hemodinámicos se han realizado en branquias (Wood, 1974; Payan y Girard, 1977; etc.). De hecho, causas hemodinámicas influyen en el intercambio iónico, por ejemplo alteraciones hemodinámicas son las responsables de la estimulación de la entrada de Cl^- por el HCO_3^- (Perry *et al.*, 1984b).

En cabeza aislada se ha estudiado también como varía la resistencia vascular al añadir adrenalina en el suero (Pärt *et al.*, 1982a). La adrenalina aumentó la resistencia vascular notablemente por una vasoconstricción alfa-adrenérgica. En un posterior estudio (Pärt *et al.*, 1982b) midieron también el intercambio de oxígeno comprobando que en ausencia de adrenalina, éste disminuía y en su presencia se mantenía estable, junto con la resistencia vascular, atribuyendo esos resultados a cambios estructurales en la laminilla secundaria.

Perry y colaboradores (1985) revisaron el comportamiento de la preparación de branquias en cabeza aislada en cuanto a intercambio gaseoso, equilibrio ácido-base y respuesta hemodinámica, utilizando suero fisiológico o sangre como líquido de perfusión. La perfusión con sangre estimuló la captación de O_2 y la excreción de CO_2 a través de las branquias, por

un aumento en la capacidad de transporte de oxígeno y la presencia de anhidrasa carbónica de los eritrocitos.

Ya centrados en el intercambio gaseoso, Pärt *et al.* (1984) estudiaron la tensión de oxígeno antes y después de las branquias concluyendo que debía haber un "shunt" no respiratorio en la segunda laminilla.

El papel de los eritrocitos y del epitelio branquial en la excreción de CO_2 fue estudiado por Perry y colaboradores (1982). La entrada de HCO_3^- en el eritrocito es el paso limitante en la excreción de CO_2 , no contribuyendo el paso de HCO_3^- desde el plasma al epitelio branquial.

Algunos trabajos se han llevado a cabo sobre la cinética de compuestos tóxicos. La principal ruta de entrada de xenobióticos al pez son las branquias. La técnica de la perfusión branquial permite obtener información valiosa sobre la biodisponibilidad de los tóxicos, pues un primer paso de esta consiste en como son captados por los organismos (Pärt, 1990).

Ejemplo de cómo estos estudios pueden ir desarrollándose es el caso del cadmio. Primeramente, Pärt y Svanberg (1981) estudiaron la absorción de cadmio por esta vía viendo como aumentaba al incrementarse el cadmio del medio. Se trataba de un experimento preliminar sobre como se producía la absorción de cadmio, lo que permitió trabajos posteriores. Así Pärt *et al.* (1985) estudiaron la disponibilidad de cadmio en diferentes calidades de agua. Por otra parte estudiaron la influencia de algunos agentes quelantes como EDTA y citrato en la absorción de cadmio (Pärt y Wikmark, 1984). Posteriormente otros

autores han estudiado la absorción de cadmio en presencia de xantatos, así como la distribución intracelular del cadmio (Block *et al.*, 1991).

La preparación de cabeza de trucha ha sido empleada para estudiar la absorción, metabolismo y eliminación del benzo[a]pyreno, demostrándose que las branquias contienen sistemas de enzimas capaces de metabolizar xenobióticos y que probablemente modificarán la absorción y toxicidad de los contaminantes en el organismo (Andersson y Pärt, 1989).

Pärt (1989a) estudió con esta técnica la relación del coeficiente de partición octanol-agua y del pH en la absorción de diversos compuestos orgánicos. Mientras que el coeficiente de partición tiene un valor limitado como indicador de la biodisponibilidad, la absorción de compuestos ionizables son pH-dependientes. Paralelamente estudió las distintas tasas de absorción branquial de fenoles en agua dulce y salada. La adaptación al agua de mar reduce la permeabilidad de las branquias para las formas no ionizadas de los compuestos (Pärt, 1989b).

La absorción de compuestos hidrofóbicos ha sido ampliamente estudiada, en sus aspectos metodológicos (Pärt *et al.*, 1992) concluyendo que la preparación es muy adecuada para investigar los mecanismos de absorción de estos compuestos en relación con sus características fisicoquímicas. Esta absorción disminuía al bajar la temperatura (Sijm *et al.*, 1993) y aumentaba con el flujo de sangre y agua (Sijm *et al.*, 1994). Posteriormente se determinó su relación alométrica (Sijm *et al.*, 1995).

Sijm (1993) observó tasas de absorción comparables para varios compuestos orgánicos y

sugirió el método como una alternativa al uso de peces, reduciendo el número necesario para cada experimento y el estrés de los mismos.

1.8.5. Utilidad de esta técnica

La preparación de cabeza perfundida posee muchas de los requerimientos de una buena preparación de perfusión branquial: cirugía rápida, no anestesia, se evitan largos períodos de isquemia, las branquias están bien irrigadas y perfundidas y el volumen del medio externo puede ser pequeño. El mayor defecto es que la presión de la aorta dorsal se tiene a cero para evitar que se derrame líquido de perfusión en el medio externo. Esto afecta al patrón de flujo a través de las branquias y contribuye al rápido deterioro de la preparación. Hay quien aumenta la presión hasta valores que no suponen pérdidas de suero.

El problema del deterioro hemodinámico puede ser superado añadiendo 10^{-7} M de adrenalina o noradrenalina al líquido de perfusión o irrigando las branquias con agua hiperóxica. El deterioro hemodinámico está limitado a la trucha (en otras especies ocurre horas después). Si se usa este pez los experimentos no pueden superar 60 min. (preferibles 30 min.) y se debe monitorizar la presión como un indicador de la viabilidad de la branquia.

Una gran ventaja de esta preparación es que el flujo eferente puede ser partido en sus componentes arteriales y venosos. Esto es posible porque el líquido que abandona la laminilla en la branquia puede volver vía eferente por las arterias filamentosas y branquiales a la aorta dorsal o ser enviado mediante anastomosis entre la arteria filamental eferente y el seno venoso filamental a la circulación venosa. Debido a esta partición es posible separar los

flujos en un componente de epitelio respiratorio (flujo a través de células respiratorias) y un componente de epitelio no respiratorio (flujo a través de células del cloruro). Así se ha demostrado que en agua dulce el flujo de Na^+ y Cl^- es a través del epitelio respiratorio mientras que en el mar tiene lugar en las células del clorhídrico. La preparación de cabeza no desarrolla estos flujos salvo el de sodio (añadiendo adrenalina).

Uno de los mayores problemas de esta preparación es separar los efectos específicos e inespecíficos, sobre todo cuando se emplean sustancias vasoactivas. Por eso es esencial monitorizar la presión. P.ej. adición de HCO_3^- eleva el flujo de Cl^- pero no específicamente sino por alteraciones hemodinámicas con alteración de la presión.

En resumen, las mayores desventajas de esta preparación son: su progresivo deterioro con el tiempo, haciéndolo únicamente adecuado para experimentos a corto plazo y bajas tasas de flujo de iones y O_2 en ausencia de catecolaminas. Las principales ventajas son: cirugía simple y rápida que no necesita anestésico, no pérdidas de agua con o sin presión dorsal aórtica y división del flujo eferente en componentes arteriales y venosos. Esta preparación es la más adecuada para estudios de transferencias de iones y gas, de corta duración (no más de 60 min). Estudios futuros deberían incorporar plasma o sangre como medio de perfusión, si fuera posible. Esto podría solucionar los problemas de formación de edema y baja capacidad de transporte de O_2 . También se sugiere aplicar niveles fisiológicos de presión en la aorta dorsal. No se recomiendan altos niveles de catecolaminas pero si 10^{-7} ó 10^{-8} adrenalina, para ayudar a solventar el deterioro progresivo.

1.9. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

La introducción de este trabajo ha permitido señalar una serie de aspectos básicos, relacionados con la entrada de sustancias químicas y de microorganismos patógenos, que tienen una enorme importancia científico-técnica y que al mismo tiempo representan aspectos de interés para la acuicultura comercial.

El objetivo básico de este trabajo es valorar las posibilidades de una metodología concreta, la perfusión de branquias en cabeza aislada, para abordar el estudio de aquellos aspectos que tienen una aplicabilidad inmediata, así como desarrollar nuevas posibilidades de esta técnica, entre las que destacan el estudio de los mecanismos que regulan estos procesos, así como un aspecto totalmente innovador: la posibilidad de estudiar esta metodología para estudiar el paso de microorganismos en la branquia.

Para ello pretendemos comprobar la validez del sistema en los siguientes apartados:

- Comprobar su capacidad para estudiar cuantitativamente la toxicocinética de compuestos estudiando su adecuación a los resultados obtenidos in vivo.
- Estudiar sus posibilidades para valorar los mecanismos que intervienen en la toxicocinética de cada compuesto.
- Comprobar la posibilidad de crear modelos mecánicos de ingreso de partículas inertes.
- Estudiar el ingreso de bacterias vía branquial mediante esta preparación.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Animales

Todos los experimentos se han realizado utilizando trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de la piscifactoría de Somolinos de la Vega (Guadalajara). Los individuos se eligieron al azar, una vez aclimatados en los acuarios.

Para las preparaciones de perfusión branquial se utilizaron truchas de un peso entre 80 y 120 gramos. Los peces se mantuvieron en acuarios de 120 litros con flujo continuo y aireación. Para los estudios *in vivo* se utilizaron animales de mayor tamaño (500-1200 g) mantenidos en grupos de 5-10 individuos en acuarios de 1600 litros.

2.1.2. Resumen de los materiales empleados

- Mantenimiento de los peces: acuarios de 120 l y 1600 l.
- Equipo experimental: motor de agua (SICCE, Italia), tubos de silicona, bomba cardiaca (IWAKI, Japón), filtro 0.2 μm (Millipore, EEUU), baño (Julabo, Alemania), registro de presión (PAN-LAB, Bélgica), transductor de presión (DRUCK, Gran Bretaña), polímetro con electrodos de sodio y de referencia (Orion, EEUU), bomba peristáltica (ISCO, EEUU).
- Material quirúrgico: cuchillo de disección, pinzas (de relojero, recta, curva, bulldog vascular), tijeras rectas, seda 4/0 (Lorca-Marín, España), tubo de polietileno PE-50, PE-90

y PE-190 (Clay Adams, EEUU), aro de plástico, ágrafes de Michel 18 x 3 mm (Medicon, Alemania), preservativos.

- Reactivos experimentales: PVP-40 (Sigma, EEUU), albúmina (Sigma, EEUU), adrenalina (Sigma, EEUU), heparina (LEO, España), 2-fenoxietanol (Merck, Alemania), nitrito sódico (Merck, Alemania), sulfato de cobre (Merck, Alemania), xileno de almizcle (Merck, Alemania), formaldehído (Merck, Alemania), Hexaclorobenceno (Merck, Alemania), amoníaco (Merck, Alemania), cloruro de cadmio (Sigma, EEUU), cianuro potásico (Sigma, EEUU), bolas de poliestireno con modificación del extremo carboxilo con fluorescencia roja (Sigma, Alemania).

- Material de histología: xilol, hematoxilina, tripsina, alcoholes, anticuerpo monoclonal anti *Renibacterium*, anticuerpo policlonal antiyersinia, PBS, anticuerpo conjugado con peroxidasa (Sigma, Alemania), anticuerpo puente para *Renibacterium* (Dako, Dinamarca), anticuerpo antiperoxidasa, Diaminobenzidina, sustrato cromógeno, hematoxilina, entellán,

- Material analítico: centrífuga de capilares (Orto, España), microjeringa (Hamilton, EEUU), tubos de ensayo, rotativa (Heidolph, Alemania), microscopio de fluorescencia (Zeiss, Alemania), espectrofotómetro (Unicam, Gran Bretaña), Espectrofotómetro de absorción atómica con cámara de grafito HGA 300 (PERKIN-ELMER, Alemania), centrífuga de mesa (IEC, EEUU), Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas (Hewlett-Packard, EEUU).

- Reactivos analíticos: sulfanilamida (Merck, Alemania), N-(-1-naftil)-etilen-diamina, ácido

nítrico suprapur (Merck, Alemania), n-hexano (Merck, Alemania)

- Medios de cultivo: SKDM (selective kidney disease medium), TSA (triptona soja agar).

2.2. Métodos

2.2.1. Perfusión branquial

La técnica de perfusión branquial es un método de reproducción *in vitro* de la fisiología branquial, en la que se aísla esta parte del animal para un mayor control de las distintas variables (Perry *et al*, 1984).

Para cada perfusión se siguió la siguiente metodología:

2.2.1.1. Circuitos

El aparataje para realizar la perfusión consta básicamente de las siguientes partes: (fig.3)

- Un circuito externo cerrado por el que circula el agua, por medio de un motor (SICCE, Italia), que representa al medio en el que vive el pez.

- Un circuito interno abierto por el que circula el líquido de perfusión impulsado por una bomba cardiaca (IWAKI, Japón). Se utilizó el suero salino Cortland (Wolf, 1963). Contenía 40 g/l de PVP-40 (polivinilpirrolidona, PM= 40.00, Sigma, EEUU) según Pärt y Wikmark (1984).

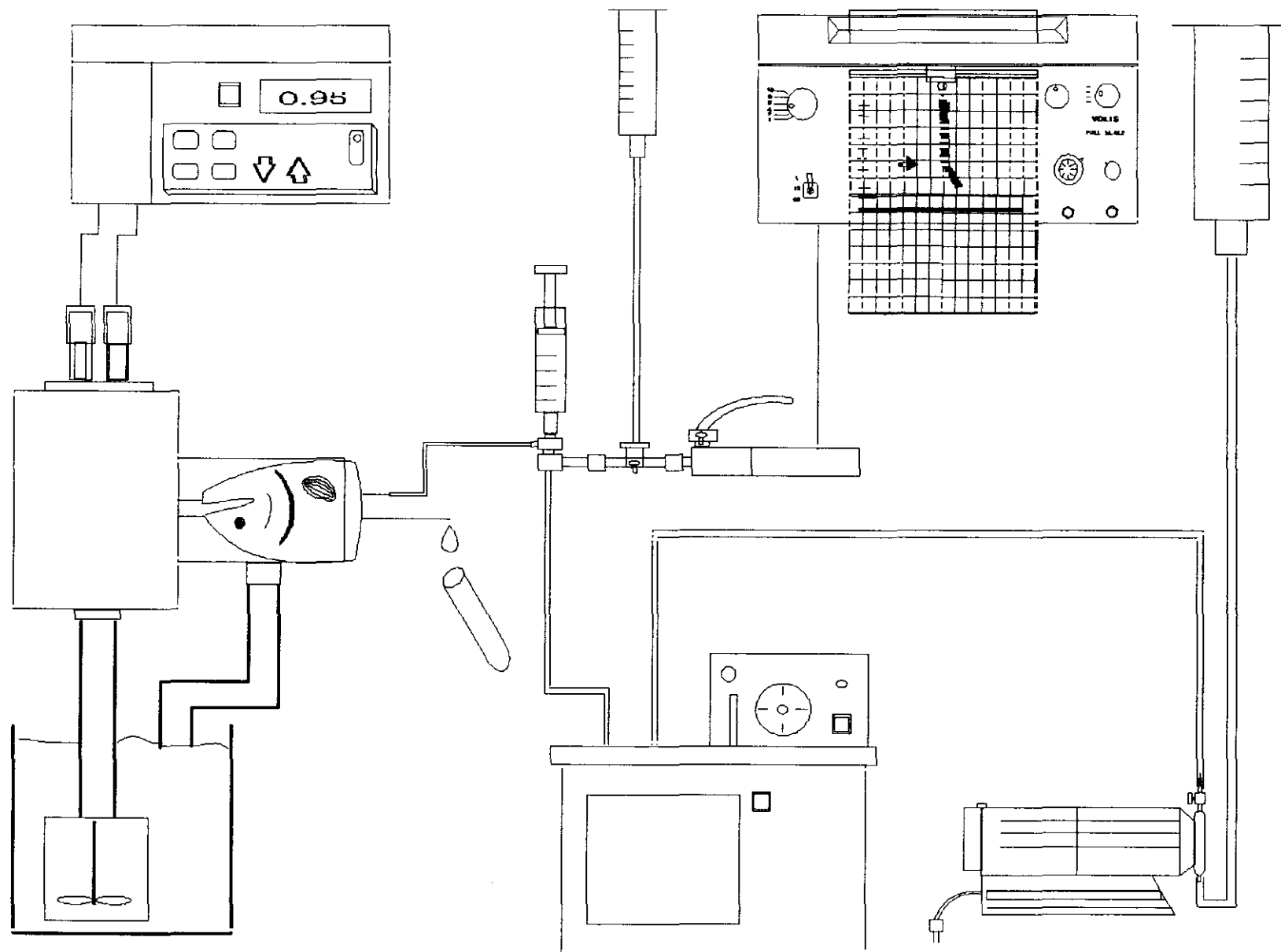


Fig. 3.

Una vez preparada la solución salina, se filtraba con un filtro de 0.2 μm (Millipore, EEUU) y posteriormente se procedía a gasearlo con una mezcla de N_2 conteniendo 0.7 % de CO_2 y 5 % de O_2 (Alphagaz, España). A continuación se añadía 1 ml/100 ml de una solución de albúmina (Sigma, EEUU) 20 % y 100 μl /100 ml de adrenalina (Sigma, EEUU) 0.1 % para prevenir la vasoconstricción espontánea (Pärt *et al.* 1982). El suero Cortland preparado se colocaba en el circuito de perfusión y se drenaba para eliminar la existencia de burbujas.

- Un receptáculo cilíndrico donde está alojada la cabeza del pez.
- La temperatura del circuito externo e interno están mantenida por un baño (Julabo, Alemania) a una temperatura de 10 °C.

2.2.1.2. Fase quirúrgica

En resumen, la operación consiste en una decapitación de la trucha, una canulación de las aortas y una preparación para su posterior colocación en el sistema.

Para la operación se siguen los siguientes pasos:

- Se pesa la trucha, cuyo peso debe estar entre 80 y 120 g.

La fase quirúrgica comienza a los veinte minutos de inyectar 2000 unidades de heparina (LEO, España) por 100 g de pez.

- Se corta la cabeza de la trucha 0.5 cm por detrás del nacimiento de las aletas operculares.
- A continuación se coloca la cabeza en la mesa de operación, haciendo pasar agua de pozo

a través de la boca para preservar la funcionalidad branquial.

- Se extraen con pinzas los órganos abdominales que queden, normalmente el hígado y un asa intestinal.
- Posteriormente, se corta el pericardio con unas tijeras rectas, quedando accesible el corazón.
- Se prepara una ligadura con seda 4/0 (Lorca-Marín, España) a la altura del bulbo aórtico usando la pinza curva y la recta de relojero.
- Enseguida se corta con tijera la punta del ventrículo para evitar que bombee en vacío.
- A continuación se introduce un tubo de polietileno PE-50 (Clay Adams, EEUU) hasta la aorta ventral. Una vez hecho esto es cuando se completa la ligadura.
- Para evitar la pérdida de agua por esta vía, se cierra el esófago con una pinza bulldog vascular.
- Por último, a fin de mantener la rigidez de la pared ventral de la cabeza, se coloca un aro de plástico en la cavidad abdominal y se grapa con tres ágrafes de Michel de 18 x 3 mm (Medicon, Alemania).

Una vez terminada esta operación se fija la cabeza al sistema para lo cual se coloca un preservativo por detrás de las branquias, uniéndose luego al sistema, por lo que queda impermeabilizada la cámara donde está instalada la cabeza.

Colocada la cabeza se conecta la bomba para hacer funcionar el circuito de líquido externo (agua de pozo) con un flujo de 1.5 l/min. para mantener una buena irrigación de las branquias. De igual modo se pone en funcionamiento la bomba cardíaca a una frecuencia de 40 pulsaciones por minuto y un flujo de 2 ml por minuto y 100 g de pez. Se conecta el

extremo libre del circuito interno a la cánula PE-50 de la aorta ventral.

Una vez que se haya drenado todo el contenido del sistema circulatorio del pez, se introduce un tubo PE-90 (Clay Adams, E.E.U.U) en la aorta dorsal. Por esta cánula tiene su salida el líquido de perfusión que ya ha pasado por la branquia. Este líquido se recoge cada cierto tiempo, dependiendo del experimento.

Se conecta el registro de presión (PAN-LAB, Bélgica) que va unido al transductor de presión (DRUCK, Gran Bretaña) situado en el circuito interno. Así mismo se introducen en la cubeta los electrodos de sodio y de referencia (Orion, EEUU), para empezar a registrar estos valores.

Cuando se han estabilizado los valores de presión y concentración de sodio se considera que la branquia está funcionando correctamente y puede procederse a la parte experimental propiamente dicha. Una vez acabado el experimento se extrajeron las branquias y se incluyeron en parafina para posteriormente realizar cortes histológicos.

2.2.2. Desarrollo experimental

2.2.2.1. Eliminación *in vivo* de nitritos

Para el desarrollo de este apartado se utilizaron 5 truchas entre 800 y 1300 g. Para cada animal se siguió el siguiente protocolo:

- Anestesia por inmersión en una solución de 0.3 ml de 2-fenoxietanol (Merck, Alemania)

por litro de agua.

- Pesado del pez.
- Colocación de una cánula rígida en la aorta dorsal.
- Inoculación intravenosa de 0.5 ml por kg de p.v. de una solución de nitrito sódico 600 ppm, para alcanzar una concentración aproximada en el pez de 3 mg/l.
- Extracción de sangre en los tiempos: 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 20, 25, 30, 37, 45 y 60 min.
- Centrifugación de la sangre en centrífuga de capilares (Orto, España) y extracción del plasma con microjeringa (Hamilton, EEUU).
- Análisis de las cantidades de nitritos en plasma.

2.2.2.2. Eliminación *in vitro* de nitritos

Se realizaron 4 perfusiones branquiales: las dos primeras se hicieron perfundiendo líquido con 3 ppm de nitritos. Las siguientes se realizaron perfundiendo, en la misma preparación, primero líquido con 1 ppm y a la mitad del experimento con 6 ppm.

Se tomaron muestras de líquido de perfusión de la cánula de la aorta dorsal cada 2 minutos así como muestras del líquido externo del circuito (agua de pozo). Las muestras se analizaron por colorimetría.

2.2.2.3. Metabolismo *in vitro* de nitritos

Se diseñó un experimento para ver la capacidad de metabolización de los nitritos *in vitro*. Para comprobar si había elementos en la sangre que metabolizaran los nitritos se prepararon

4 tubos, cada uno de los cuales contenía: sangre completa, plasma, líquido de perfusión y líquido de perfusión con hematíes. Se les añadió un estándar de nitritos para obtener alrededor de 3,5 ppm. Se colocaron en una rotativa (Heidolph, Alemania) y se mantuvieron allí tomando muestras en los tiempos siguientes: 0,1,2,3, y 24 horas. Las muestras se centrifugaron en una centrífuga de mesa, diluyendo posteriormente el sobrenadante, para su análisis. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado.

2.2.2.4. Absorción *in vivo* de nitritos

Se utilizaron 3 truchas de pesos comprendidos entre 530 y 625 g.

Cada una de ellas se mantuvo en acuario con un flujo continuo de 2.7 mg/l de nitrógeno nitroso (1/10 de la CL50 para las condiciones de calidad de agua empleadas). Considerando la rápida transformación de los nitritos, se consideró necesario realizar una exposición en flujo continuo con el objeto de garantizar los resultados. Para ello se usó una bomba peristáltica (ISCO, EEUU) para suministrar la solución de nitritos y un mezclador para mezclar el flujo de entrada de agua de pozo con la fuente de nitritos.

Se realizaron extracciones de sangre en el seno caudal a los tiempos 0, 30, 60, 90, 120 min., 4, 6, 8 y 24 horas. Se analizó la concentración de nitritos en plasma.

2.2.2.5. Absorción *in vitro* de nitritos

Para la determinación de la absorción *in vitro* de nitritos se utilizaron 4 truchas. En cada perfusión se mantuvo una concentración de 3 ppm de nitritos en el agua externa del circuito.

Para comprobar la capacidad del sistema para reproducir el funcionamiento in vivo, aplicado al caso de los nitritos una de las preparaciones se realizó utilizando un medio externo sin cloruros.

Se tomaron muestras de líquido de perfusión de salida cada 2 minutos así como muestras del líquido externo. Las muestras se analizaron por colorimetría.

2.2.2.6. Eliminación *in vitro* de cobre

Se realizaron 4 preparaciones: dos con 1500 ppb de cobre y dos con 1500 y posteriormente 300 ppb. Las preparaciones se realizaron perfundiendo suero salino Cortland con las concentraciones citadas de cobre en forma de sulfato. Se tomaron muestras de líquido de perfusión de la cánula de la aorta dorsal cada 2 min. y también de líquido externo.

2.2.2.7. Eliminación *in vitro* de cobre con células

Se realizaron tres preparaciones en las cuales se perfundieron las branquias con cobre a una concentración de 1500 ppb. En la mitad de la preparación se añadió al líquido de perfusión sangre del propio animal extraída previamente (0.5 ml de sangre por 50 ml de líquido de perfusión).

Se tomaron muestras de líquido de perfusión cada 2 min. y también de líquido externo.

2.2.2.8. Absorción *in vitro* de cobre

Se realizaron tres preparaciones en las cuales, una vez estabilizada la perfusión se añadieron cantidades de cobre en el líquido externo hasta conseguir unas concentraciones de 100 ppb y 200 ppb al comienzo y a la mitad de la preparación respectivamente.

Se tomaron muestras de líquido de perfusión cada 2 min. y también de líquido externo.

Se analizaron las concentraciones de cobre en líquido de perfusión y en agua del circuito externo. Se midieron además patrones de líquido de perfusión sólo con sangre para comprobar si ésta añadía una cantidad de cobre apreciable a las muestras.

2.2.2.9. Absorción *in vitro* de xileno de almizcle

Para el estudio de absorción de xileno de almizcle se realizaron 3 preparaciones.

En primer lugar, se preparó una solución de 10 mg de xileno de almizcle en 50 ml de etanol. En cada preparación se fueron realizando adiciones de esa solución en el medio externo para alcanzar 1, 10 y 100 $\mu\text{g/l}$ de xileno de almizcle en los tiempos 0, 20 y 40 min., respectivamente.

Se tomaron muestras de líquido de perfusión cada 5 min. y de medio externo cada 20 min., analizándose las muestras mediante un procedimiento de microextracción diseñado

específicamente para estos experimentos.

2.2.2.10. Eliminación *in vitro* de xileno de almizcle

Se realizaron dos preparaciones en las cuales se pasó por el circuito de perfusión 10 ppb de almizcle. Se tomaron muestras de líquido de perfusión cada 5 min. así como dos muestras de agua externa, a la mitad y al final del experimento.

En todos los casos se tomaron muestras de líquido de perfusión cada 5 min. y de medio externo cada 20 min., analizándose las muestras mediante un procedimiento de microextracción diseñado específicamente para estos experimentos.

2.2.2.11. Eliminación de xileno de almizcle con células

Se realizaron 2 preparaciones en las que se pasaron sucesivamente 5 ppb, 10 ppb y al final 10 ppb más 0.5 ml de sangre de la propia trucha. Se sacó sangre de las truchas antes de decapitar.

En todos los casos se tomaron muestras de líquido de perfusión cada 5 min. y de medio externo cada 20 min., analizándose las muestras mediante un procedimiento de microextracción diseñado específicamente para estos experimentos.

2.2.2.12. Ingreso de partículas vía branquial

Se utilizaron bolitas de látex, poliestireno, de $0.5\ \mu\text{m}$ en suspensión acuosa de un 2.5 % de sólidos, con modificación del extremo carboxilo, con fluorescencia de color rojo (Sigma, Alemania).

Se realizaron dos preparaciones en las que se añadieron $200\ \mu\text{l}$ de la solución comercial a 400 ml de agua externa. Se tomaron muestras de líquido de perfusión cada 10 min. y muestras de branquias para congelación e inclusión en parafina. También se tomaron branquias de una trucha las cuales se tuvieron el mismo tiempo en el líquido externo y las branquias de una trucha que no estuvo en contacto con las bolitas de látex. La mitad de las muestras se lavó con agua de pozo para eliminar las bolitas de látex adheridas a su superficie. Se realizaron cortes de $5\ \mu\text{m}$ de grosor y se examinaron las preparaciones en microscopio de fluorescencia (Zeiss, Alemania). Varios de los cortes se tiñeron con hematoxilina para proporcionar marcar núcleos y contornos celulares.

Las muestras de líquido de perfusión se prepararon de la siguiente manera:

- Los tubos originales se centrifugaron a 16° , 16 min. a una velocidad de 4500 rpm. El sedimento se analizó a microscopio de fluorescencia.
- El sobrenadante se pasó por un filtro de $0.22\ \mu\text{m}$, conservando el filtro que se resuspendió en 8 ml de agua, la cual se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Tanto el sobrenadante como el sedimento se analizaron al microscopio.

Un control positivo, al que se añadieron las partículas fluorescentes, sufrió el mismo proceso.

2.2.2.13. Ingreso de bacterias vía branquial

2.2.2.13.1. Cultivo

Se usaron dos especies de bacterias: *Renibacterium salmoninarum* y *Yersinia ruckery*. *Renibacterium* se cultivó en placas de cultivo con medio SKDM (selective kidney disease medium) (Austin *et al.*, 1983). *Yersinia* se cultivó en placas de cultivo con medio TSA (triptona soja agar).

Los subcultivos se realizaron de la siguiente manera:

- *Yersinia*: se realizaron cada 24-48 horas con hisopo a una placa con medio TSA.
- *Renibacterium*: se realizaron cada 14-28 días, procedentes de líquido ascítico de truchas infectadas.

Ambos se mantuvieron en cultivo a 20°C.

La cuantificación se realizó mediante siembra de 20 µl por placa de diluciones sucesivas de una suspensión de media placa en 10 ml de agua de pozo filtrada con un filtro de 0.22 µm.

De este modo se prepararon dosis de 10 ml con 10⁹ bacterias.

2.2.2.13.2. Inactivación de las bacterias

Se tomo media (*Yersinia*) o una (*Renibacterium*) placa con un hisopo y se resuspendió con 10 ml de agua de pozo filtrada de modo que se obtuviera una concentración de 1 x 10⁹

bacterias. La suspensión se inactivó añadiendo 200 μ l de formol. Tras agitación, se dejó reposar una noche. Posteriormente se centrifugó 5 min. a 5000 rpm. Se volvió a resuspender el sedimento en 10 ml de agua de pozo filtrada, agitándose posteriormente.

2.2.2.13.3. Perfusión branquial

El protocolo experimental se llevó a cabo en dos fases:

En la primera se realizaron 11 preparaciones: 3 con *Yersinia*, 3 con *Renibacterium*, una con una mezcla de ambas, otra con *Yersinia* en presencia de hexaclorobenceno (1 mg/l), otra con *Renibacterium* y partículas de látex y otras 2 con bacterias inactivadas: *Yersinia* y *Renibacterium*.

En la segunda se realizaron 2 preparaciones con la presencia de cada uno de estos tóxicos y *Renibacterium salmoninarum*:

- 0.3 mg/l de cobre (cloruro).
- 1 mg/l de hexaclorobenceno.
- 80 mg/l de amoníaco total.
- 0.15 mg/l de cadmio (cloruro).
- 0.1 mg/l de cianuro potásico.

En cada preparación se añadió una suspensión de bacterias en agua de pozo, a una concentración de 10^9 bacterias por ml.

Cuando se emplearon tóxicos, el protocolo observado fue el siguiente: tras la fase de

estabilización inicial se añadió el tóxico al agua en la concentración señalada (tiempo cero).

A los cinco minutos se añadió la suspensión bacteriana.

Las muestras de líquido de perfusión se centrifugaron a 4°C durante 10 min. a 5000 rpm, se resuspendió el sedimento en agua destilada para lisar los restos celulares, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placa. Se escogieron las colonias morfológicamente similares a las buscadas y se hicieron subcultivos para la posterior identificación por "PCR" e "Inmunoblotting".

Se tomaron muestras de branquias en cada preparación que se mantuvieron en formalina neutra 24 horas pasando posteriormente a etanol 70%. Posteriormente se incluyeron en parafina de bajo punto de fusión para realizar las pruebas de inmunohistoquímica.

2.2.2.13.4. Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes de 5µm a partir de bloques en parafina de bajo punto de fusión. Se colocaron en portas gelatinizados.

Las preparaciones se sometieron a los siguientes procesos:

- Desparafinar las muestras, en tres baños sucesivos de xilol de 5 minutos cada uno.
- Hidratación de las muestras, en una batería de alcoholes desde alcohol absoluto.
- Tripsinización para desenmascarar el antígeno, con tripsina al 0.1 %, 1 min.
- Lavado con PBS 3 veces 5 min. cada vez.

- Incubación con el anticuerpo primario a la concentración adecuada en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Para la detección de *Renibacterium* se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón a una dilución 1/4000. Para la detección de *Yersinia* se utilizó un anticuerpo policlonal antiyersinia a una dilución 1/1000. Las concentraciones adecuadas se calcularon previamente usando distintas diluciones sobre una muestra de bacterias secas.

- Lavado 3 veces con PBS, 10 min cada una.

- En las muestras con *Yersinia* se incubó 30 min. con el anticuerpo conjugado con peroxidasa (Sigma, Alemania) a una dilución de 1/200.

En las muestras con *Renibacterium* se incubó con un anticuerpo puente (DAKO, Dinamarca) a una dilución 1/25 y , tras tres lavados 5 min en PBS, se incubó 30 min. con el anticuerpo antiperoxidasa.

- Incubación con el sustrato: Diaminobenzidina en el primer caso y sustrato cromógeno en el segundo.

- Lavado

- Contraste de los núcleos con hematoxilina.

- Montaje en un medio definitivo (entellán) para las preparaciones de *Yersinia* y en glicerina para las de *Renibacterium*.

- Identificación y valoración de las zonas marcadas al microscopio a 400 y 1000 aumentos.

2.3. Análisis, cálculos y estadística.

2.3.1. Análisis y cálculos estadísticos

La concentración de nitritos en agua, plasma y líquido de perfusión se analizó por el método colorimétrico de la sulfanilamida (Rodier 1981). En resumen, consiste en una diazotación de la sulfanilamida que forma un compuesto coloreado con la N-(-1-naftil)-etilen-diamina. El color se midió en espectrofotómetro (Unicam, Gran Bretaña) a 540 nm. En casos de muestras muy pequeñas de líquido se hizo usando triple cantidad de reactivo, al producirse así el mayor ajuste en pruebas preliminares.

Las concentraciones de cobre en líquido de perfusión y en agua del circuito externo se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (PERKIN-ELMER, Alemania) con cámara de grafito HGA 300 (Fernández y Kahn, 1971). Las muestras de líquido de perfusión se sometieron, previamente, a una digestión ácida con ácido nítrico suprapur (Merck) durante una hora a 90° C.

El análisis de muestras de xileno de almizcle se realizó mediante un sistema de micro-extracción líquido-líquido con cuantificación final por Cromatografía de Gases con detector selectivo de masas, descrita con los siguientes pasos:

- Medición de un volumen determinado de muestra (< 8 ml) y adicción de 1.5 ml de n-hexano.
- Agitación en rotativa (Heidolph, Alemania) durante 10 min.
- Centrifugación a 2700 rpm durante 10 min en una centrífuga de mesa (IEC, EEUU).

- Separación de la fase orgánica en un vial de inyección.
- Inyección de 6 μ l de cada muestra en el cromatógrafo de gases-masas con detector selectivo de masas (Hewlett-Packard, EEUU). Intercaladas entre las muestras inyección de los patrones de la recta de calibración.
- El cálculo de las concentraciones de las muestras se realizó por interpolación en la recta patrón, multiplicando por 1.5 ml de hexano y dividiendo entre el volumen de muestra tomado.

Se usó el programa estadístico Statgraph para los cálculos estadísticos.

2.3.2. Cálculos cinéticos

Para la eliminación *in vivo* se utilizó un modelo asumiendo una cinética compartimental. Se seleccionó un modelo monocompartimental para los nitritos de acuerdo a los resultados obtenidos experimentalmente. Este modelo queda descrito por la siguiente ecuación:

$$C_t = Ae^{-\alpha t} \quad (1)$$

en la que C_t es la concentración en plasma en el tiempo t , A el punto de corte con el eje de ordenadas y α la pendiente de la curva.

Para el caso del cobre se seleccionó un modelo bicompartimental, pero utilizando sólo la fase de eliminación, quedando una ecuación similar, pero utilizando B y β en vez de A y α

$$C_t = Be^{-\beta t} \quad (2)$$

Se calcularon otros parámetros cinéticos a partir de los valores de A y α (Carbonell y Tarazona, 1994):

El área bajo la curva de concentración en plasma *versus* tiempo (AUC)

$$AUC = \frac{A}{\alpha} \quad (3)$$

El tiempo medio de residencia (MRT)

$$MRT = \frac{\frac{A}{\alpha^2}}{AUC} \quad (4)$$

El aclaramiento o "clearance" branquial (CLb)

$$CL = \frac{Dosis}{\frac{AUC}{A}} \quad (5)$$

Y la semivida de eliminación ($t_{1/2}$)

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\alpha} \quad (6)$$

El volumen de distribución, clave para las comparaciones *in vitro* / *in vivo*, se calculó por la fórmula:

$$Vd = \frac{Dosis}{\frac{A}{A}} \quad (7)$$

Del mismo modo, para comprobar la adecuación del modelo se hallaron esos términos a partir de un modelo no compartimental (Barron *et al.*, 1990):

El área bajo la curva de concentración plasma *versus* tiempo (AUC). Se calcula usando la regla trapezoidal (Gibaldi y Perrier, 1982), debiendo añadir a AUC_n, la última parte bajo la curva, es decir, desde el último punto hasta el corte con el eje de abscisas (AUC_{term}).

$$AUC = AUC_n + AUC_{term} \quad (8)$$

Donde AUC_n es igual a

$$AUC_n = \int_{t_0}^{t_n} C_i dt = \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (C_i + C_{i+1}) / 2 \quad (9)$$

y

$$AUC_{term} = \frac{C_n}{\alpha} \quad (10)$$

Para calcular el tiempo medio de residencia de la sustancia (lo que representa el tiempo necesario para eliminar el 63.2 % de la dosis) se emplea la siguiente ecuación:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad (11)$$

Donde AUMC es el área de la curva concentración-tiempo *versus* tiempo o curva de momento. Entonces, del mismo modo que en la ecuación (7)

$$AUMC = AUMC_n + AUMC_{term} \quad (12)$$

Donde

$$AUMC_n = \int_{t_0}^{t_n} t C_i dt = \sum_{i=0}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (t_i C_i + t_{i+1} C_{i+1}) / 2 \quad (13)$$

y

$$AUMC_{term} = \frac{t_n C_n}{\alpha} + \frac{C_n}{\alpha^2} \quad (14)$$

El aclaramiento branquial (CL_b)

$$CL_b = \frac{Dosis}{\frac{AUC}{\alpha}} \quad (15)$$

El volumen de distribución (V_{ss})

$$V_{ss} = CL_b * MRT = \frac{Dosis * AUMC}{AUC^2} \quad (16)$$

La tasa de eliminación se define como la razón existente entre la cantidad de sustancia eliminada por unidad de tiempo y la cantidad total de sustancia intercambiable en el organismo. En los modelos monocompartimentales, la cantidad total de sustancia intercambiable en el organismo es directamente proporcional a la concentración en el plasma, así, la tasa de eliminación puede ser calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$TASA DE ELIMINACION = \frac{Q_t - Q_{t+1}}{Q_t} = \frac{C_t - C_{(t+1)}}{C_t} \quad (17)$$

que de acuerdo con la ecuación (1) quedaría:

$$\frac{C_t - C_{(t+1)}}{C_t} = \frac{Ae^{-\alpha t} - Ae^{-\alpha(t+1)}}{Ae^{-\alpha t}} = 1 - e^{-\alpha} \quad (18)$$

El método de la perfusión branquial permite estimar la pérdida de sustancia en la branquia (diferencia entre la concentración de entrada y de salida del medio de perfusión). De acuerdo con la definición previa, la tasa de eliminación vía branquial se calculó *in vitro* por la siguiente ecuación:

$$TASA \ DE \ ELIMINACION = \frac{Q_t - Q_{(t+1)}}{Q_t} \quad (19)$$

La pérdida neta de nitritos puede ser estimada de la diferencia entre las concentraciones de entrada (C_{inp}) y salida (C_{out}) en el medio de perfusión y su flujo (F_{per}). La cantidad total intercambiable teórica de nitritos puede ser calculada a partir de la concentración de entrada en el medio de perfusión y del volumen de distribución:

$$TASA \ DE \ ELIMINACION = \frac{(C_{inp} - C_{out}) F_{per}}{C_{inp} \cdot V_d} \quad (20)$$

Un método similar se empleó con los datos de absorción pero usando la concentración en el agua (C_w), en lugar de la concentración en el plasma. Las ecuaciones finales son:

$$TASA \ DE \ ABSORCION = \frac{C_t - C_{(t-1)}}{C_w} \quad (21)$$

para los cálculos *in vivo* y

$$TASA\ DE\ ABSORCION = \frac{(C_{out} - C_{inp}) F_{per}}{C_w \cdot Vd} \quad (22)$$

para la absorción branquial *in vitro*.

Se usó una cinética de primer orden para el metabolismo *in vitro*, estableciendo un modelo similar al descrito en la ecuación 1.

RESULTADOS

3.1. Eliminación *in vivo* de nitritos

La tabla II muestra los resultados obtenidos para cada uno de los cinco animales utilizados en la prueba de eliminación *in vivo* de nitritos.

Tabla II. Concentración (mg/l de N-NO₂) en plasma tras la inoculación intravenosa de 30µg/100g de pez.

Tiempo (minutos)	1	2	3	4	5
0	0.36	0.013	0.017		0.04
2	4.2	4.8	4.1	3.2	3.5
4	2.8	3.9	3.2	2.7	3.1
7	2.9	3.3	2.7	2.5	2.4
9		3.2	2.2		
11	2.7				
14	2.5	2.4			
20	2.1	1.7	1.5		
25		1	1.2		
30	1.5	1.08	1.4		
37	1.19		0.6		
45	0.99	0.8	0.6		
60	1.1	0.5		0.4	0.5
75	0.36	0.5			
105		0.3			
180					0.2
240				0.19	
1440				0.05	

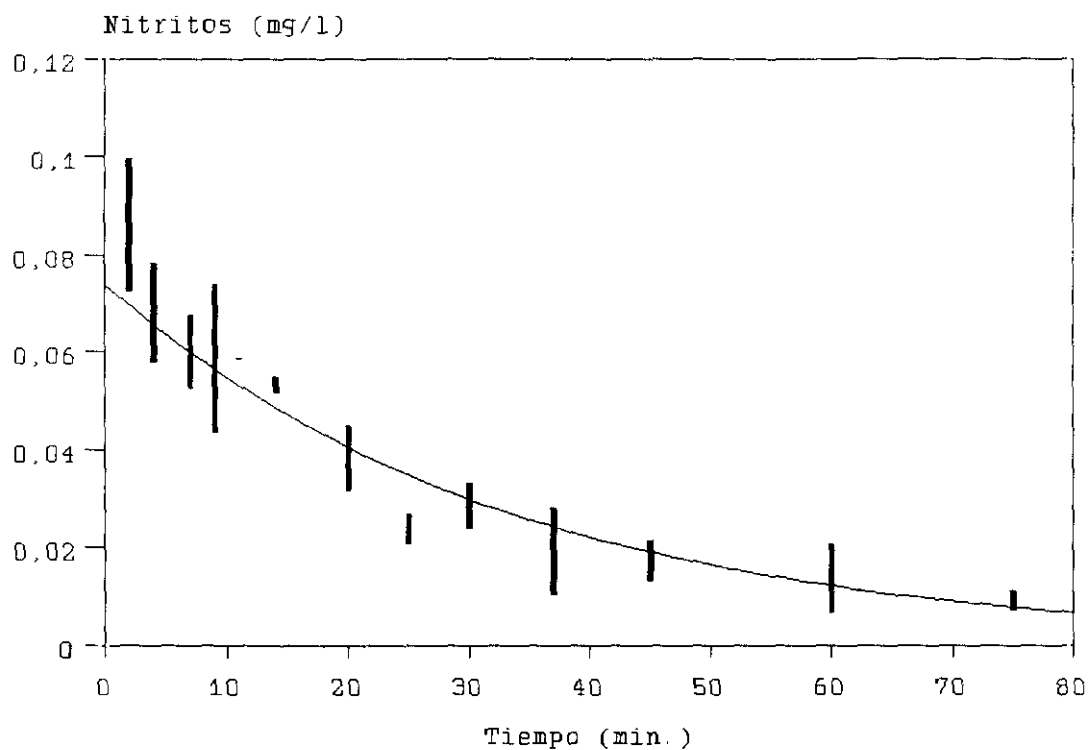


Fig. 4. Eliminación *in vivo* de nitritos.

Estos resultados aparecen resumidos en la Fig.4.

A la vista de estos resultados se decidió aplicar un modelo monocompartimental al análisis de los datos. Los resultados de esta aplicación aparecen en la tabla II. La ecuación final que explica la eliminación *in vivo* de los nitritos es

$$C_t = 3.6 e^{-0.034t}$$

De los datos generales se obtuvo una tasa de eliminación (T.E.) = 0.034 ± 0.007 .

Tabla III. Parámetros toxicocinéticos obtenidos para un modelo monocompartimental, comparados con los resultados de un análisis no compartimental.

	Modelo monocompartimental	Modelo no compartimental
A	3.60 ± 0.36	
α	0.034 ± 0.0073	
AUC	107.68 ± 22.19	111.19 ± 13.52
MRT	30.17 ± 7.34	25.91 ± 7.34
CL_b	0.28 ± 0.051	0.27 ± 0.034
V_{ss}	8.38 ± 0.80	7.02 ± 1.19
$t_{1/2\alpha}$	20.91 ± 5.088	

3.2. Eliminación *in vitro* de nitritos

La Tabla IV recoge los resultados de las cuatro preparaciones de branquias en cabeza aislada que se realizaron para estudiar la eliminación de nitritos *in vitro*. Los asteriscos indican cuando cambió la concentración. En las dos primeras preparaciones, cuando se estabilizó la perfusión se pasó una concentración de 3.8 y 3.9 mg/l de nitritos, respectivamente. En las preparaciones 3 y 4 se comenzó con una concentración de 0.77 mg/l de nitritos y a mitad de preparación (cuando indican los asteriscos) se pasó a 6.53 mg/l de nitritos.

Tabla IV. Concentración de nitritos (mg/l) en líquido de perfusión.

Tiempo (minutos)	1	2	3	4
0	0	0	0	0
2	0	0.1*	0	0
4	0	0.13	0	0.32
6	0.02	0.2	0	0.62
8	0.02*	1.9	0	0.78
10	0.02	3.1	0	0.81
12	0.06	3.5	0	0.83
14	0.03	3.8	0.07	0.81
16	1.6	3.8	0	0.81
18	3.0	3.8	0.037	0.81
20	3.5	3.8	0.176	0.81
22	3.5		0.104	0.81
24	3.7		0.170*	0.81*
26	3.7		1.31	
28	3.7		2.86	2.56
30	3.7		4.65	4.99
32	3.7		4.90	5.44
34	3.8			6.11
36	3.8		4.57	6.40
38			5.44	5.40
40			5.44	2.9
42			5.57	
44			5.53	5.90
46			5.57	6.40
48				6.55

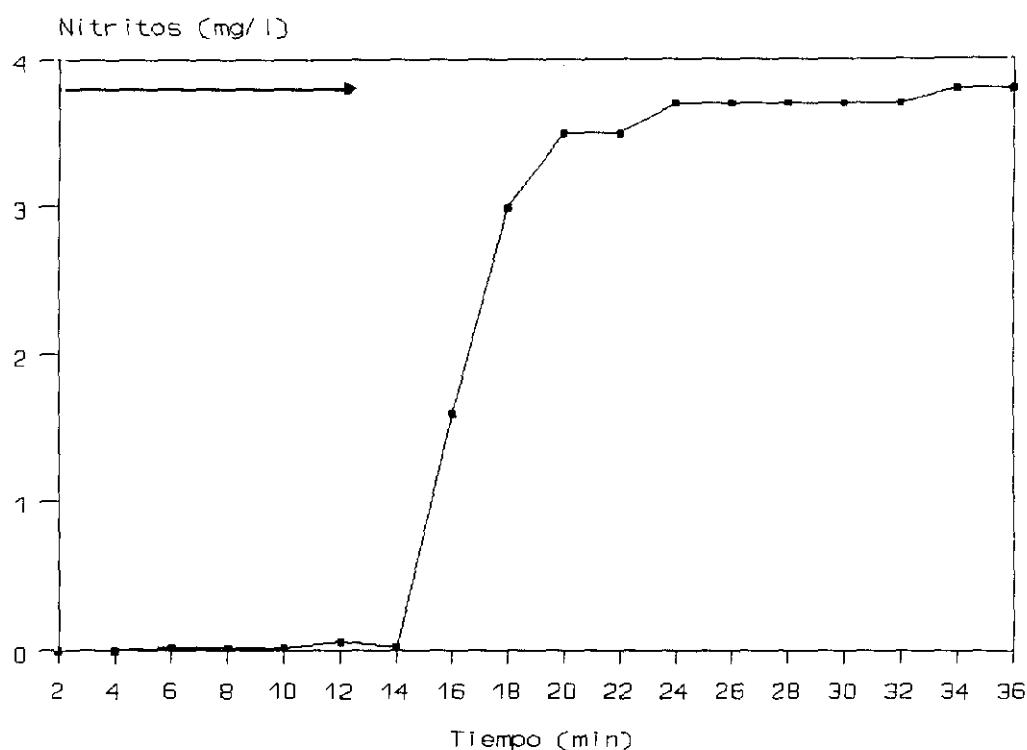


Fig. 5. Eliminación *in vitro* de nitritos

La fig. 5 representa los valores de la primera de las preparaciones de branquia realizadas. La flecha indica la concentración de nitritos de entrada en líquido de perfusión.

A partir de los datos parece que no se ha producido eliminación por la branquia. Para comprobar que esta observación no está condicionada por el límite de sensibilidad de la técnica analítica utilizada, se calculó la máxima tasa de eliminación que sería observada en las condiciones utilizadas en el estudio. Dicho cálculo se basó en el coeficiente de variación, medido mediante una serie de replicados. Así se obtuvo una tasa de eliminación máxima no observable

$$T.E._{max} = 0.0038$$

$$\text{y una } \alpha_{max} = -0.038$$

3.3. Metabolismo/captación *in vitro* de nitritos por los eritrocitos

La tabla V recoge los resultados del experimento de metabolismo *in vitro* de nitritos, en el que se compararon distintos medios y su capacidad para hacer desaparecer los nitritos de la fracción soluble: sangre completa de trucha, plasma, líquido de perfusión y líquido de perfusión al que se le añadieron hematies de trucha arco iris. Para cada medio se realizaron cuatro replicados, que aparecen en la tabla con las letras A, B, C y D.

Tabla IV. Metabolismo *in vitro* de nitritos.

		Tiempo (horas)				
Replicados		0	1	2	3	24
Sangre completa	1A	3.09	2.24	1.27	0.97	-
	1B	3.21	2.36	1.39	1.27	-
	1C	3.21	2.12	1.51	1.51	-
	1D	3.03	2	1.27	0.97	-
Plasma	2A	2.97	2.73	2.85	2.61	2.49
	2B	2.97	2.91	2.97	2.73	2.49
	2C	2.97	2.91	3.03	2.61	2.49
	2D	2.91	2.85	2.97	2.61	2.49
Líquido de perfusión	3A	2.97	2.85	3.09	2.73	2.97
	3B	2.97	2.91	2.97	2.18	3.4
	3C	2.97	2.97	2.97	2.97	2.95
	3D	2.97	2.97	3	2.97	2.79
Líquido de perfusión + hematies	4A	2.97	1.88	1.39	1.27	0
	4B	2.85	1.88	1.27	1.39	0
	4C	3.09	2	1.58	1.58	0
	4D	2.73	2.24	1.58	1.76	0

En la figura 6 se representan las curvas de ajustes para las distintos medios del experimento de metabolismo *in vitro* de nitritos. Se representan también las desviaciones típicas de los distintos replicados.

A partir de estos datos se calculó una α metabólica de 0.34 ± 0.06 y una tasa de eliminación atribuible al metabolismo

$$T.E.metab = -0.41 \pm 0.09$$

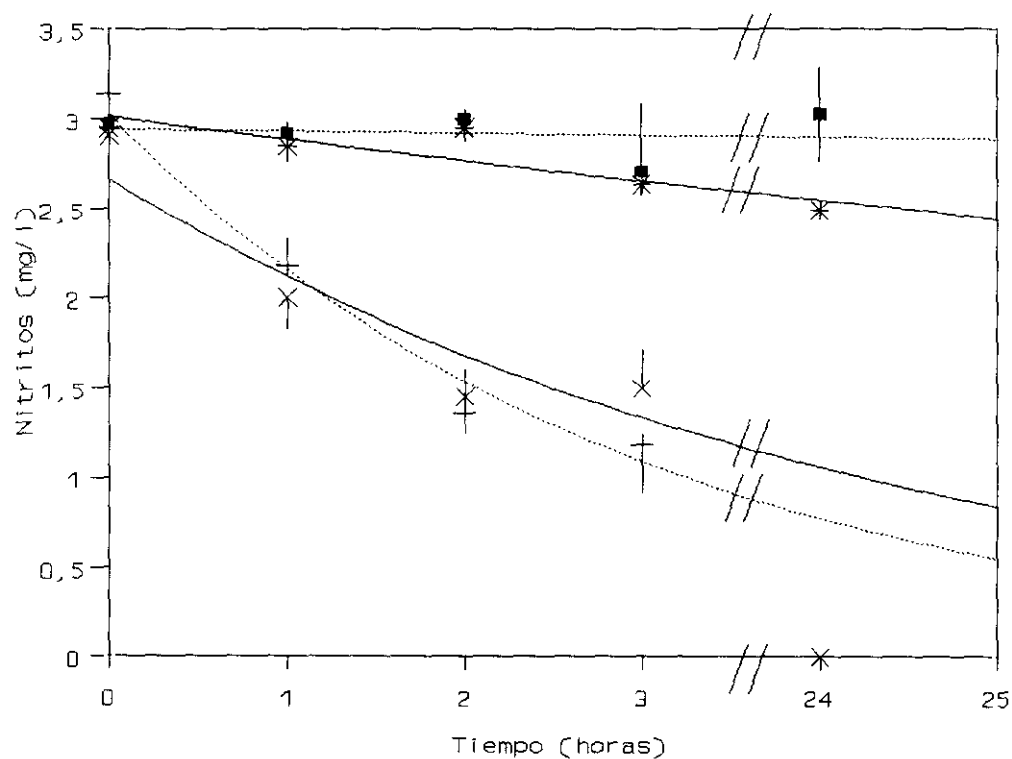


Fig. 6. Metabolismo *in vitro* de nitritos. Sangre (■), plasma (*), líquido de perfusión (+) y líquido de perfusión con hematies (x).

3.4. Comparación *in vivo* / *in vitro*

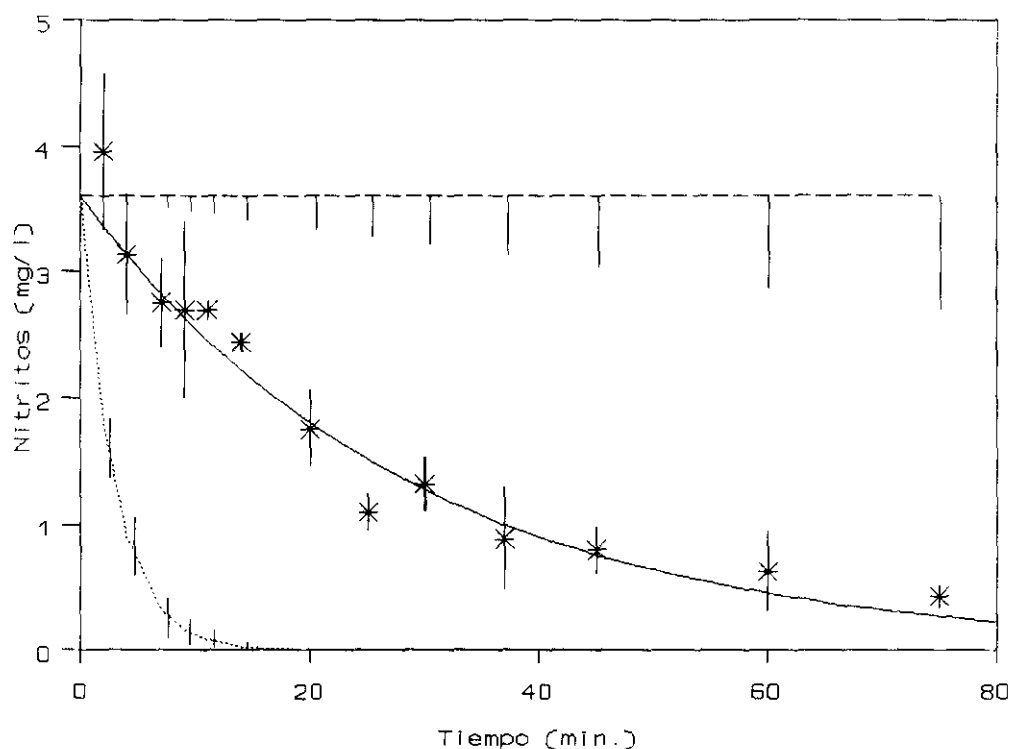


Fig. 7. Eliminación de nitritos.

En la fig. 7. Se representa una visión global de la eliminación de nitritos en la trucha arcoiris. La figura muestra los valores reales (*); el ajuste a un modelo monocompartimental (—); la eliminación branquial esperada calculada a partir de la tasa *in vitro* (---); y el metabolismo-absorción por hematies calculado por la tasa *in vitro* (...). En la eliminación *in vivo* y el metabolismo *in vitro* las barras verticales representan la desviación típica; en la eliminación branquial *in vitro*, las barras representan la máxima eliminación no observable de acuerdo con la sensibilidad de la técnica.

La figura muestra como la eliminación calculada a partir de los datos *in vitro* no puede explicar la bajada que se produce en la curva de eliminación *in vivo*. Sin embargo, los datos

de metabolismo o captación por hematies explicarían el rápido descenso en los niveles plasmáticos de nitritos observados *in vivo*.

3.5. Absorción *in vivo* de nitritos

La tabla VI recoge los datos obtenidos en los tres peces en los que se realizó la prueba de absorción *in vivo* de nitritos. La figura 8 representa la media y desviación típica de estos datos.

Tabla VI. Concentración de nitritos (mg/l) en plasma de truchas en acuario con una concentración de 1.5 mg/l de nitritos.

Tiempo (minutos)	1	2	3
0	0.08	0.2	0.1
30	0.49	0.57	0.26
60	0.69	1.04	0.87
90	1.14	1.71	1.71
120	1.28	1.8	2.59
240	2.63	1.8	3.02
360		1.8	2.68

Utilizando los datos de la primera fase (absorción lineal) de la curva anterior se obtuvo una tasa de absorción

$$T.A. = 0.011 \pm 0.002$$

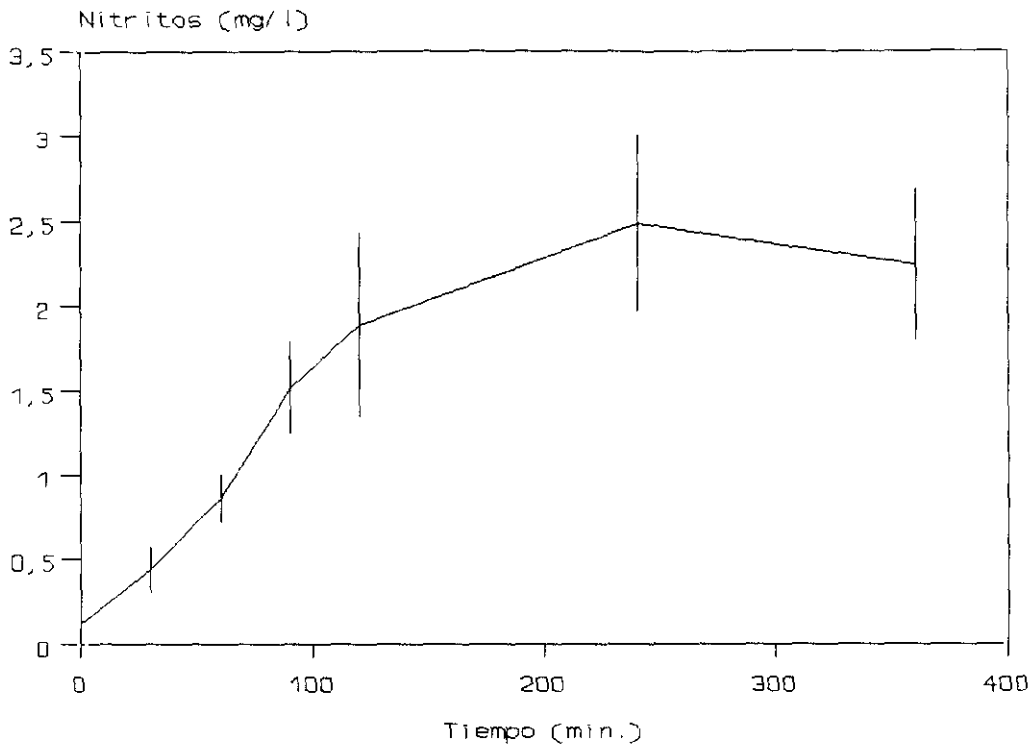


Fig. 8. Absorción in vivo de nitritos.

3.6. Absorción *in vitro* de nitritos

La tabla VII recoge los resultados de las tres preparaciones de branquias en cabeza aislada de trucha que se realizaron en el estudio de absorción *in vitro* de nitritos. En estas preparaciones se hizo circular un medio externo con una concentración de nitritos entre 1.5 y 3 mg/l.

Tal como aparece en la figura 9, en todos los casos se observó un aumento progresivo de la concentración de nitritos en el perfusado hasta un máximo o meseta, produciéndose después un descenso. Esta disminución no se observó para ningún otro compuesto y no puede ser satisfactoriamente explicado, pero, en cualquier caso, la fase inicial de la curva justifica la necesidad de utilizar la meseta en los cálculos de tasas. Así mismo, en la figura 6 puede verse como la preparación previa que se realizó en agua sin cloro (línea punteada), alcanzó valores de absorción muy elevados con respecto a las otras preparaciones (línea continua).

Tabla VII. Concentración de nitritos en líquido de perfusión (mg/l).

Tiempo (minutos)	1	2	3
0	0	0	0
2	0.096	0	0.015
4	0.092	0.061	0.088
6	0.115	0.09	0.116
8	0.096	0.11	0.116
10	0.132	0.10	0.112
12	0.108	0.096	0.096
14	0.094	0.096	0.104
16	0.084	0.09	0.076
18	0.092	0.096	0.076
20	0.084	0.091	0.064
22	0.084	0.073	0.06
24	0.056	0.063	0.048
26	0.068	0.073	0.048
28	0.056	0.07	0.044
30	0.061	0.05	0.048
32	0.051	0.055	0.038
34	0.043	0.07	0.031
36	0.043		0.031
38	0.033		0.029
40	0.018		0.025
42			0.025
44			0.027
46			0.021
48			0.025
50			0.017
52			0.011
54			0.011
56			0.011
58			0.009
60			0.007
62			0.006
64			0.006
66			0.005

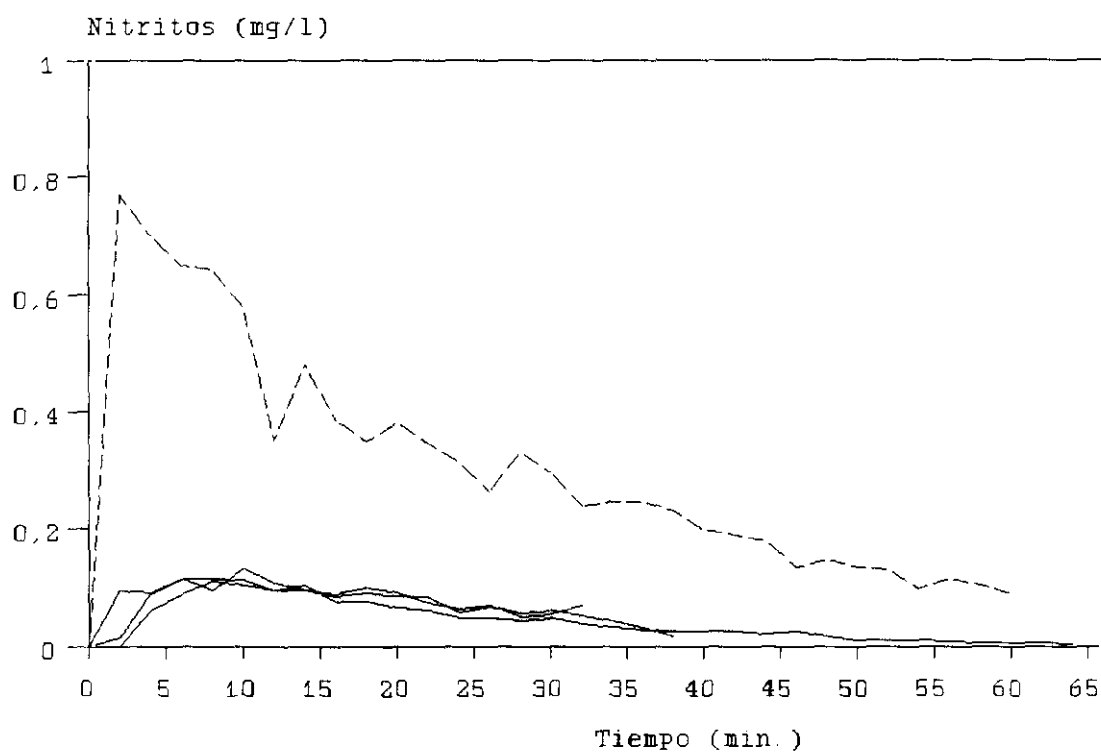


Fig. 9. Absorción *in vitro* de nitritos.

La figura 10 muestra los valores reales de absorción (*); el ajuste lineal (—); y la absorción branquial esperada calculada a partir de la tasa *in vitro* (----). Las barras verticales representan las desviaciones típicas.

Se tomaron en cuenta los valores de la meseta de las curvas, obteniéndose una tasa de Absorción *in vitro*

$$\text{T.A.} = 0.013 \pm 0.005$$

mientras que *in vivo* alcanza un valor similar

$$\text{T.A.} = 0.011 \pm 0.002$$

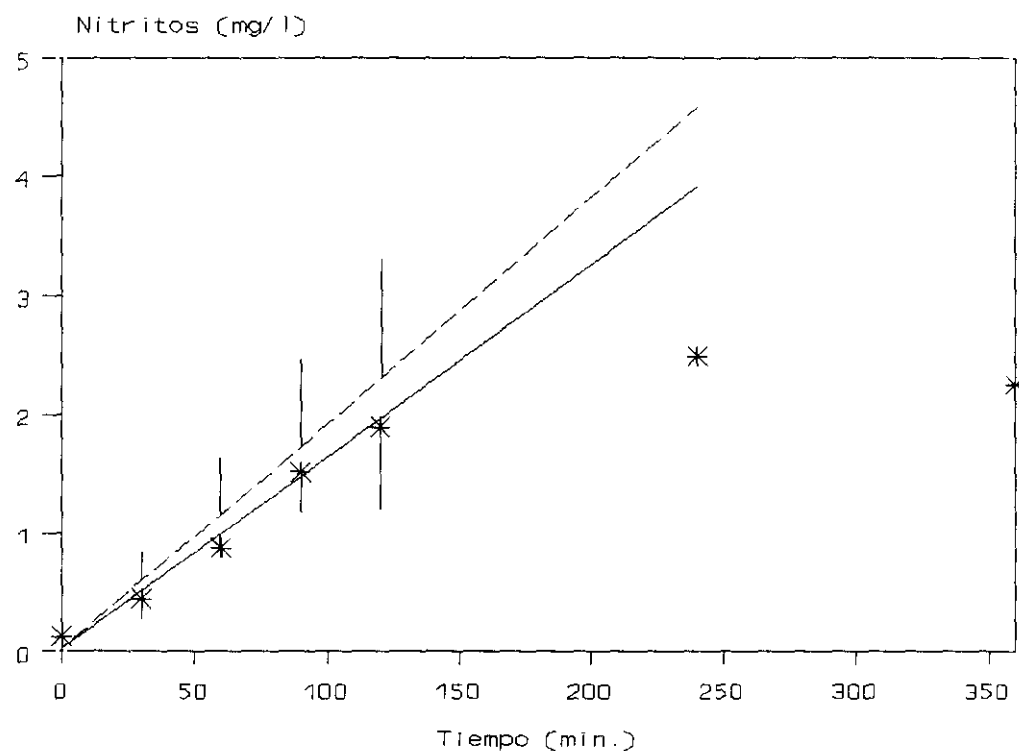


Fig. 10. Absorción de nitritos en trucha arco iris.

Tabla VIII. Resumen de las tasas de absorción y eliminación de nitritos.

	<i>IN VIVO</i>	<i>IN VITRO</i>
Absorción de nitritos	0.011 ± 0.002	0.013 ± 0.005
Eliminación de nitritos	0.033 ± 0.007	0*
Metabolismo de nitritos	-	0.41 ± 0.091

* No hay diferencia entre la concentración de entrada y salida. La máxima tasa de eliminación no detectable podría ser 0.0038 de acuerdo con la sensibilidad de la técnica.

3.7. Eliminación *in vitro* de cobre

La tabla IX recoge los valores de concentración de las muestras tomadas en las cuatro preparaciones de branquia en cabeza aislada. En las cuatro preparaciones se emplearon las siguientes concentraciones de cobre en el líquido de perfusión: preparación 1 (1664 $\mu\text{g/l}$), preparación 2 (1951 $\mu\text{g/l}$), preparación 3 (2161 y 428 $\mu\text{g/l}$) y preparación 4 (1025 y 408 $\mu\text{g/l}$). En su caso, los asteriscos representan el punto en que cambió la concentración.

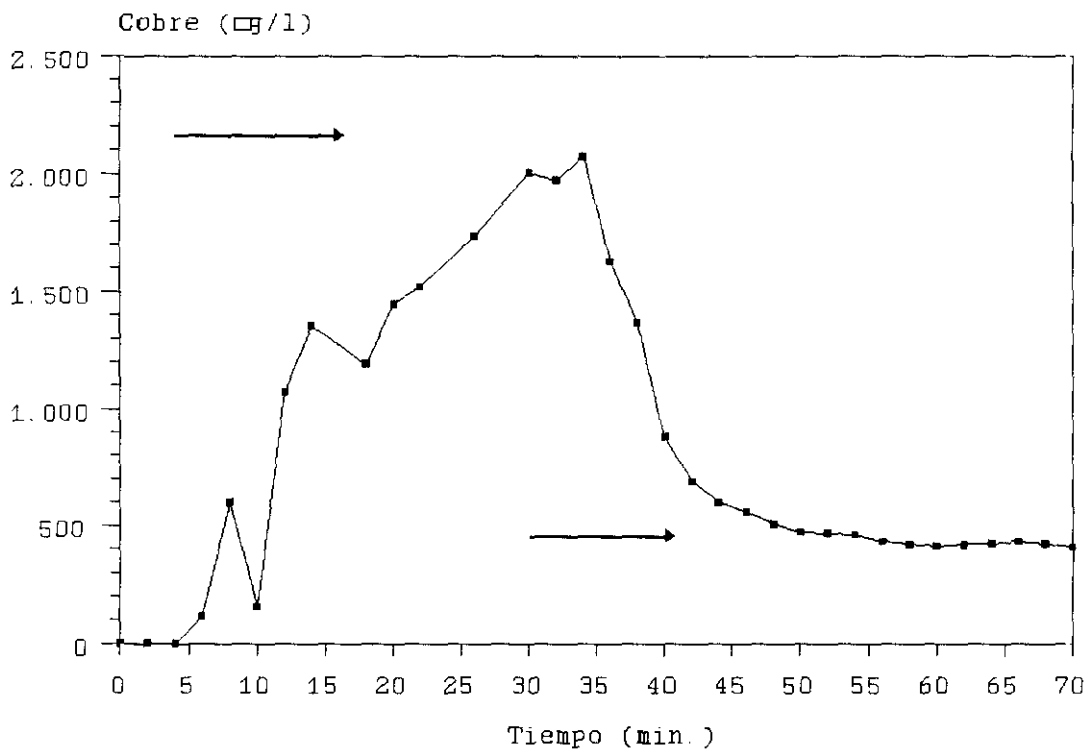


Fig. 11. Eliminación de cobre *in vitro*.

La figura 11 representa los valores de una preparación de cobre *in vitro*. Las flechas indican los valores iniciales de cobre perfundido, que como se señaló antes se cambiaron a mitad de la preparación.

Tabla IX. Concentración de cobre ($\mu\text{g/l}$) en líquido de perfusión.

Tiempo (minutos)	1	2	3	4
0	0	0	0	0
2	286	22	0	0
4	78	842	0	32
6	728	1417	114	417
8		1652	600	536
10		1614	156	794
12	988		1070	783
14	1378	1751	1353	900
16	1170	1739		912
18	1430	1826	1190	876
20	1430	1876	1447	926
22	1092	1832	1521	904
24	1586	1819		1016
26	1456	1875	1737	965
28	1378	1848		967
30		1971	2005	740
32	1430	1815	1973	501*
34		1782	2074*	454
36		1814	1628	401
38	1404	1717	1367	444
40	1222		881	483
42	1248		688	493
44	1404		601	473
46	1196		560	471
48			508	443
50	1222		471	470
52			469	278
54	702		461	331
56			435	360
58	1404		421	378
60			411	380
62			420	350
64			426	
66			434	
68			426	380
70			412	350
72				366

3.8. Eliminación *in vitro* de cobre con célulasTabla X. Concentración de cobre ($\mu\text{g/l}$) en líquido de perfusión.

Tiempo (minutos)	1	2	3
0	0	0	0
2	0	22	0
4	96	120	67
6	136	920	1063
8	149	1464	1361
10	159	1311	1461
12	156	1388	1472
14	160	1375	1502
16	158	1392	1351
18	147	1319	1507
20	144	1388	1521
22	143	1437	1472
24	146	1461	1449
26	161	1373	1452
28	198	1559	1348
30	143	1552	1471
32	180*	1515*	1448*
34	180	1466	1474
36	208	1650	1404
38	208	1576	1556
40	204	1510	1277
42	204	1628	1278
44	202	1569	1597
46	202	1493	1547
48		1579	1664
50		1505	1664
52		1155	1674
54		1236	1490
56		1463	1518
58		1253	1519
60		1248	1695

La tabla X recoge los valores de concentración de cobre en las tres preparaciones. En los tres casos las concentraciones de entrada (C_{inp}) fueron 178, 1428 y 1559 $\mu\text{g/l}$ respectivamente. Los asteriscos indican el momento en que se empezaron a perfundir hematies.

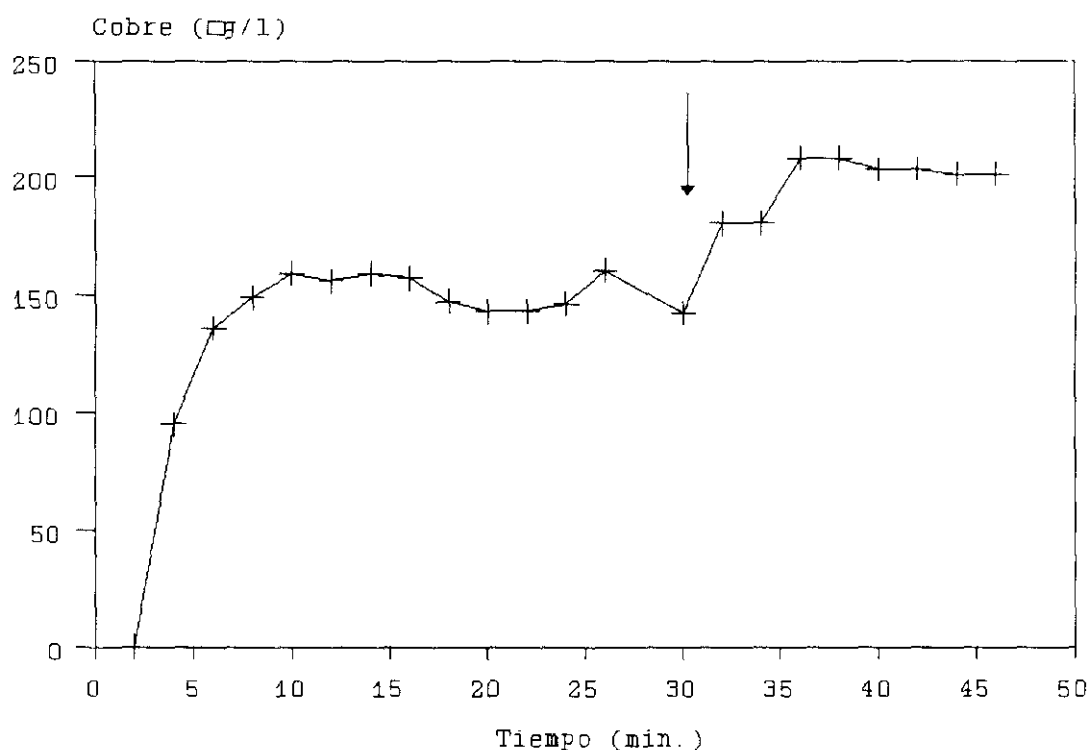


Fig. 12. Eliminación de cobre *in vitro*, con y sin células.

La figura 12 representa una de las series de datos del experimento de eliminación de cobre con y sin hematies. Se puede observar la subida en el nivel de cobre de salida (disminución en la eliminación branquial hacia el medio) conforme empiezan a perfundirse hematies conjuntamente con el líquido de perfusión (flecha).

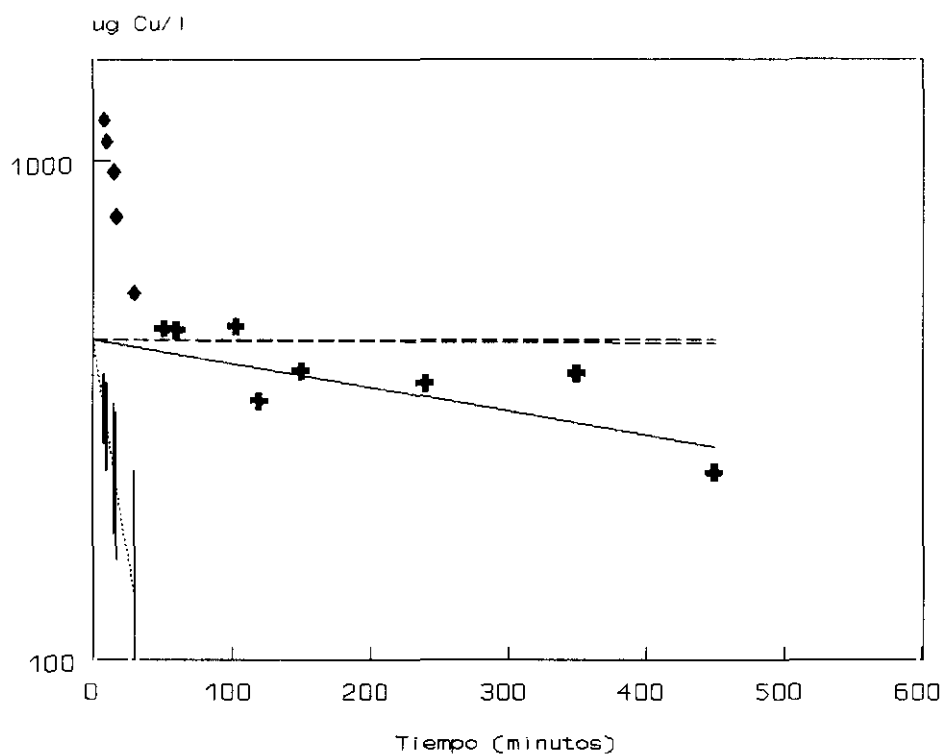


Fig. 13. Eliminación de cobre en trucha arco iris.

Los resultados conjuntos sobre la eliminación de cobre en trucha arcoiris se muestran en la Fig.13. Los valores reales *in vivo* están representados por símbolos. Sobre estos está representada la recta de regresión de la fase lenta o de eliminación del modelo bicompartimental (————), la recta que representa la eliminación *in vitro* con células (----) y la curva de eliminación *in vitro* (...) en la que se representan por barras horizontales las desviaciones típicas.

La tabla XI. muestra un resumen de las tasas de eliminación de cobre *in vivo* e *in vitro*, y dentro de este, con la utilización o no de células en el líquido de perfusión.

Tabla XI. Tasas de eliminación de cobre en trucha arco iris.

	<i>IN VITRO</i>	<i>IN VIVO</i>
Sin células	0.038 ± 0.024	0.0035 ± 0.0005
Con células	0 ± 0.03	

3.9. Absorción *in vitro* de cobre.

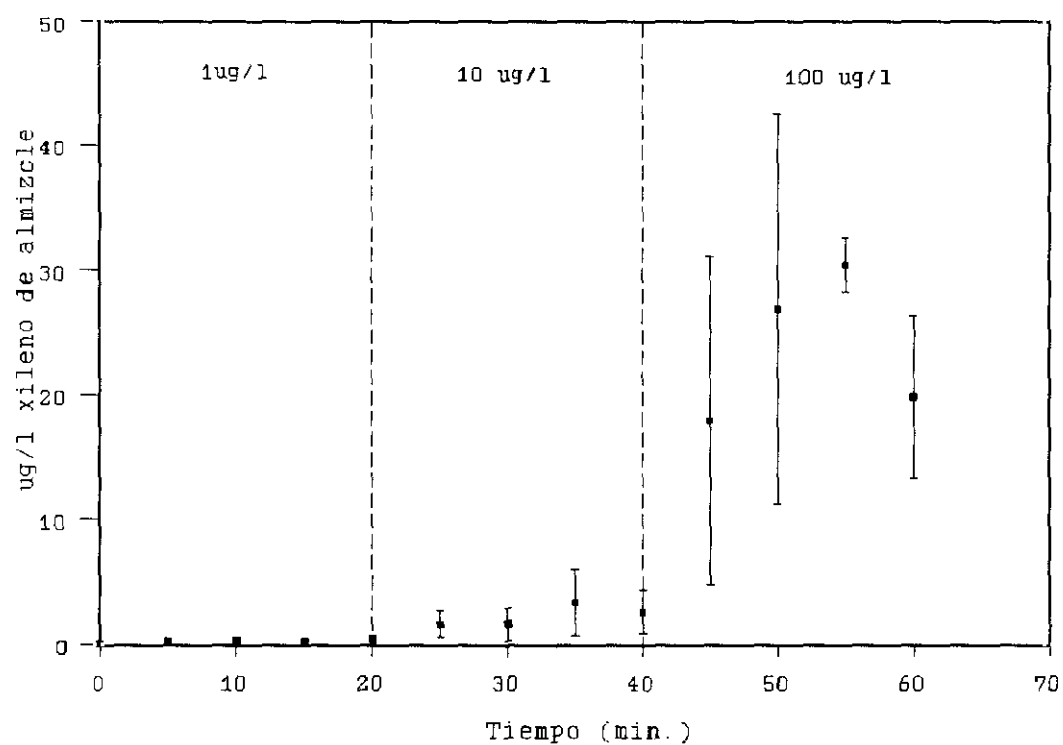
No se detectaron cantidades apreciables de cobre en líquido de perfusión. De todos modos pudiera haberse producido una reducida absorción por debajo del límite de detección ($18.5 \mu\text{g/l}$).

3.10. Absorción *in vitro* de xileno de almizcle.

La tabla XII recoge los valores de xileno de almizcle en líquido de perfusión recogidos durante las tres preparaciones de branquias en cabeza aislada que se realizaron. Durante cada preparación se añadieron al medio externo $1 \mu\text{g/l}$ en el minuto 0, $10 \mu\text{g/l}$ en el minuto 20 y $100 \mu\text{g/l}$ de xileno de almizcle en el minuto 40. La figura 14 representa, separados por línea discontinua los tres periodos de tiempo, los valores medios de concentración de las tres preparaciones. Las barras representan las desviaciones típicas.

Tabla XII. Concentración de xileno de almizcle ($\mu\text{g/l}$) en líquido de perfusión.

Tiempo (minutos)	1	2	3
0	0.06	0.04	0.08
5	0.07	0.2	0.5
10	0.14	0.2	0.6
15	0.12	0.2	0.5
20	0.2	0.3	0.7
25	0.5	1.8	2.6
30	0.7	2.6	
35	1	2.8	6.3
40	0.8	2.7	4.3
45	6.9	32.4	14.5
50	10.2	41.2	29.4
55		28.9	32
60		15.2	24.4

Fig. 14. Absorción *in vitro* de xileno de almizcle.

3.11. Eliminación *in vitro* de xileno de almizcle

La tabla XIII recoge los valores de concentración de xileno de almizcle en las dos preparaciones que se realizaron. La figura 15 representa los valores medios y sus desviaciones típicas mediante barras.

Tabla XIII. Concentración de xileno de almizcle ($\mu\text{g/l}$) en líquido de perfusión.

Tiempo (minutos)	1	2
0	0.09	0.10
5	0.09	0.09
10	0.4	1.2
15	0.8	1.1
20	1.3	1
25	1.6	1.4
30	1.5	1.4
35	2.2	1.5
40	1.2	2
45	1.5	1.8
50	1.6	2.2
55	1.8	2.1
60	1.8	2.1

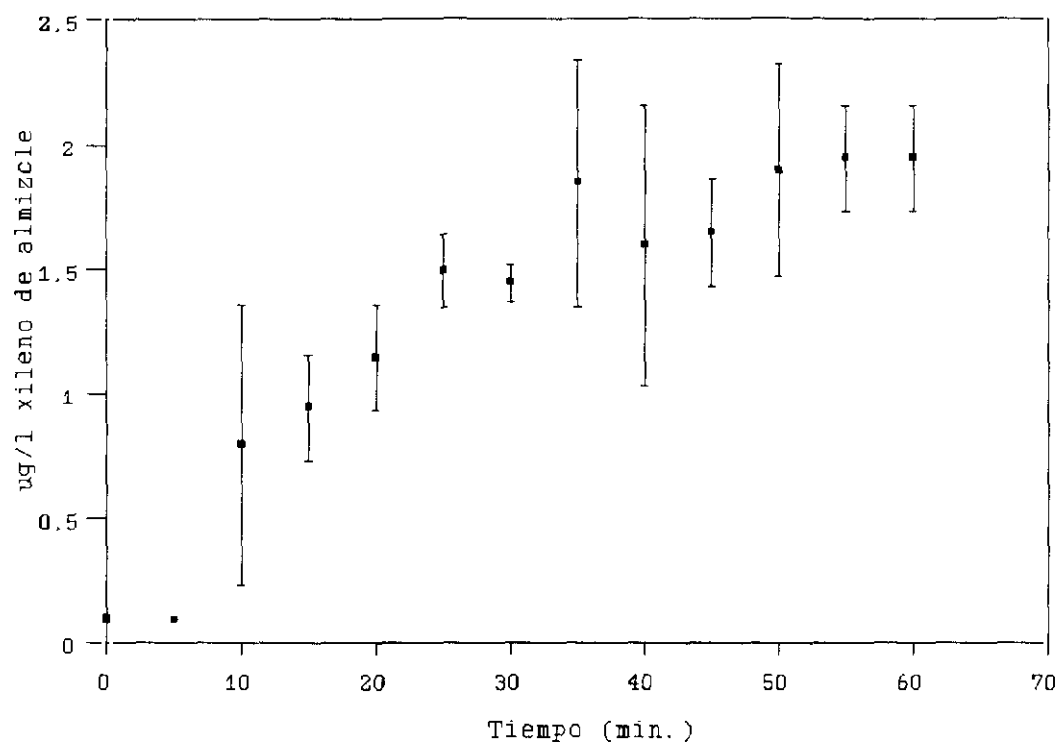


Fig. 15. Eliminación *in vitro* de xileno de almizcle.

3.12. Eliminación de xileno de almizcle con células

La Tabla XIV contiene los valores de concentración de las dos preparaciones que se realizaron utilizando células sanguíneas en el líquido de perfusión. La figura 16 representa los valores medios de dichas preparaciones y las desviaciones típicas por medio de barras. Con líneas discontinuas se han separados las tres partes en que se dividió cada preparación con respecto a la concentración base del líquido de perfusión: del minuto 0 al 15 ($5 \mu\text{g/l}$), del minuto 15 al 35 ($10 \mu\text{g/l}$) y del minuto 35 al 60 ($10 \mu\text{g/l}$ y células sanguíneas).

Tabla XIV. Concentración de xileno de almizcle ($\mu\text{g/l}$) en líquido de perfusión.

Tiempo (minutos)	1	2
0	0.09	0.09
5	0.8	0.19
10	1.3	0.19
15	1.4	0.5
20	1.5	0.6
25	1.6	0.7
30	2.2	0.9
35	2	1.1
40	2.7	1
45	4.4	1.8
50	4.1	5.2
55	4.6	3.8
60	4.8	4.5

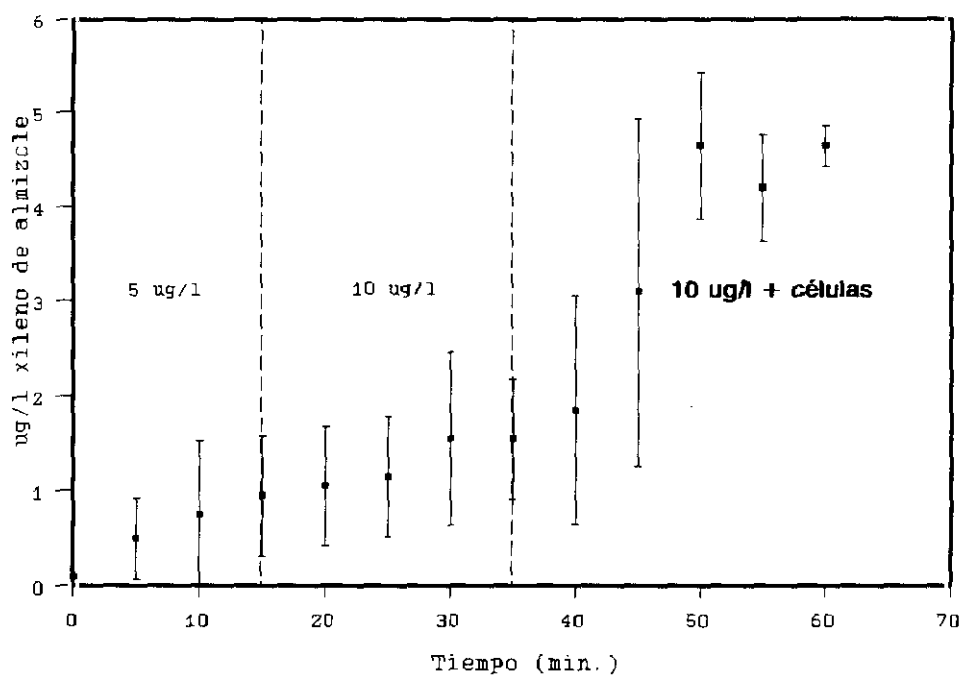


Fig. 16. Eliminación *in vitro* de almizcle de xileno en presencia de hematies.

3.13. Ingreso de partículas via branquial

En todas las muestras de líquido de perfusión analizadas no pudo encontrarse ninguna partícula fluorescente. Sin embargo se recuperaron claramente en el sedimento de un control positivo. En los cortes de branquias controles no apareció ninguna partícula marcada con fluorescencia naranja. Tampoco se encontraron en las muestras de branquias lavadas. Sin embargo, se encontraron partículas fluorescentes en el interior del tejido de las preparaciones experimentales, lavadas, tal como aparece en la fig. 17 excluyéndose así la posibilidad de que hubieran quedado pegadas.

3.14. Ingreso de bacterias vía branquial

De ninguna de las muestras de líquido de perfusión se pudo aislar *Renibacterium salmoninarum*, si bien estas muestras suelen tener una gran contaminación. Además, ni la técnica de PCR ni el inmunoblotting fueron capaces de detectar esta bacteria en líquido de perfusión. Por otra parte, tampoco fue posible detectar la presencia de *Yersinia ruckery* en líquido de perfusión por bacteriología convencional.

Los mismos resultados se obtuvieron en las preparaciones de *Renibacterium* cuando se aplicaron tóxicos en la perfusión.

Con la técnica de inmunohistoquímica tampoco fue posible detectar la presencia de *Renibacterium salmoninarum* en el tejido branquial. Sin embargo, dicha técnica permitió comprobar el paso al epitelio branquial de *Yersinia ruckery* (figura 18).

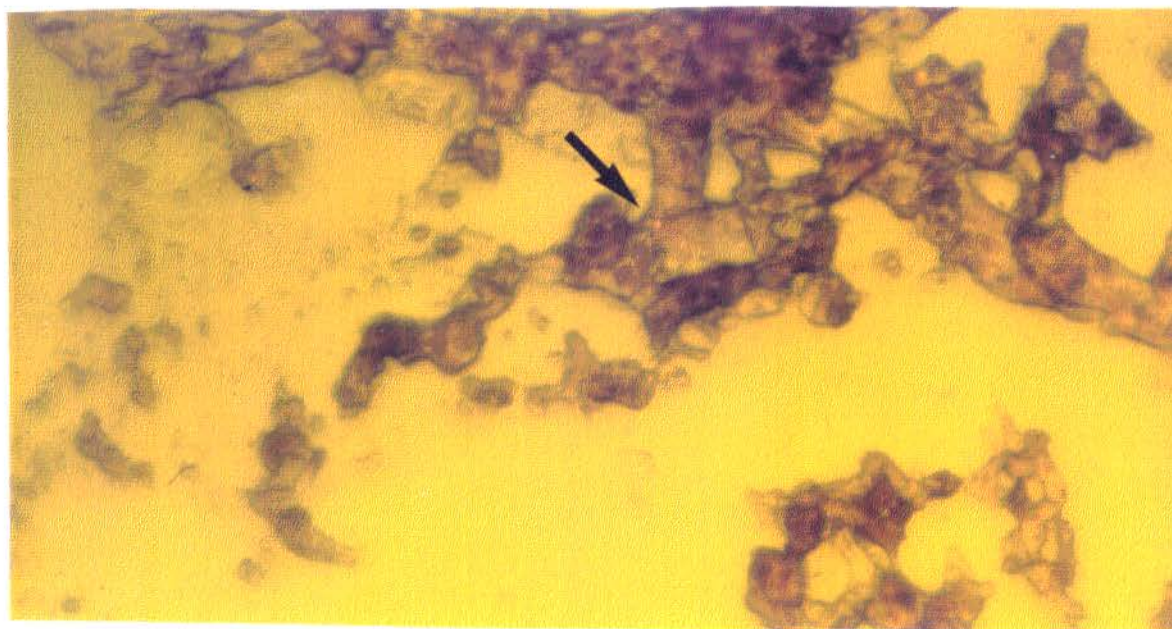


Fig. 17. Corte histológico (400 x) de branquia de trucha arco iris tras la perfusión branquial con bolitas de latex fluorescentes. La flecha señala una partícula fluorescente dentro de una célula epitelial branquial



Fig. 18. Corte histológico de branquia de trucha arco iris con técnica inmunohistoquímica. La flecha señala bacterias (*Yersinia ruckeryi*) marcadas por la técnica, en el tejido branquial

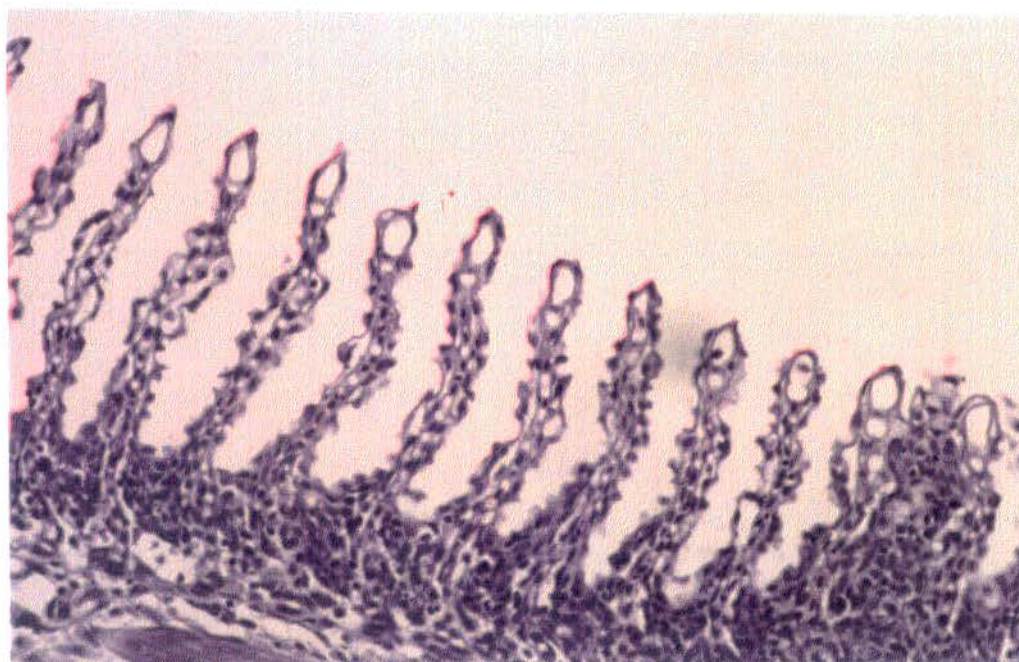


Fig. 19. Corte de una branquia tras la perfusión branquial. Tinción: hematoxilina-eosina.

DISCUSIÓN

1. Utilidad de la perfusión branquial para la producción intensiva de truchas.

El trabajo que aquí se presenta ha permitido confirmar las posibilidades de la técnica empleada, la perfusión branquial, mediante las aplicaciones metodológicas desarrolladas y validadas con los experimentos que aquí se presentan, como herramienta aplicativa que permite valorar una serie de aspectos que consideramos de gran interés para el sector socioeconómico de la producción intensiva de peces.

Nuestros resultados sugieren como el sistema sirve para estimar la biodisponibilidad de contaminantes presentes en el medio acuático. Se ha adaptado el sistema para estudiar la absorción y la eliminación de compuestos, ante diferentes calidades de agua. En estos compuestos se han desarrollado estudios cinéticos compartimentales demostrando la buena concordancia con los estudios realizados *in vivo*. Por este medio se ha conocido la toxicocinética de compuestos de interés. Asimismo la técnica ha resultado eficaz para abordar estudios cinéticos sobre compuestos cuyas características hacen muy difícil otros abordajes convencionales.

El conjunto de los resultados indica que esta técnica permite establecer cuantitativamente la tasa de absorción y eliminación, las modificaciones, también cuantitativas en estas tasas en función de las condiciones de calidad de agua, así como determinar los posibles mecanismos y estructuras que intervienen en la cinética de un compuesto dado.

Todas estas aplicaciones tienen una gran importancia dentro del mundo de la acuicultura. Podemos conocer los niveles de exposición a contaminantes, así como la influencia de la calidad de agua. En este sentido debemos considerar que las condiciones de calidad de agua de las piscifactorías de nuestro país, abarcan un amplio espectro en cuanto a pH, dureza y conductividad eléctrica (MOPU, 1983; Tarazona et al., 1990).

Nuestro sistema va a permitir extrapolar el estudio de cinética en la trucha de un contaminante conocido, para cualquier condición de calidad de agua. Además permitirá, conocer, mediante esta técnica, como puede ser la biodisponibilidad de un tóxico conocido en un tramo de agua en concreto, con sus características específicas de calidad de agua, antes de que se monten las instalaciones de una nueva piscifactoría.

En otro apartado, nuestros resultados demuestran que se puede utilizar el modelo de perfusión branquial para estudiar el ingreso en el pez de antígenos particulados, como modelo de infección. Este resultado ha sido validado por su uso con dos tipos de bacterias.

La importancia de la branquia como órgano de entrada de agentes infecciosos, nos permite estudiar este proceso de ingreso mediante la técnica de perfusión branquial lo que se convierte en una herramienta eficaz en la lucha contra estas enfermedades que suponen regularmente grandes pérdidas económicas: por las bajas, por el descenso en la ganancia ponderal y por las grandes inversiones que hay que hacer en farmacoterapia, muchas veces con pocos resultados.

En el caso de agentes infecciosos, se puede conocer en qué medida pueden éstos ingresar en

el organismo. Esto aporta información de importancia en tres campos fundamentales. Primero, se sabe que el ineficaz control de algunas infecciones piscícolas de interés se debe al desconocimiento de el mecanismo de ingreso en el organismo animal. En segundo lugar abre paso a la utilización de vacunas mejorando el ingreso del antígeno y, por tanto, la protección. Por último, nuestro sistema permite valorar como puede influir la presencia de un contaminante en la entrada de determinados agentes patógenos, problema que ha sido ampliamente observado y es de gran importancia económica.

2. La perfusión branquial como alternativa a los estudios *in vivo*.

Las preparaciones *in vitro* de branquias han sido ampliamente utilizadas para estudiar la fisiología branquial. Ya a principios de siglo (Krakow, 1913) comenzaron a usarse estas preparaciones que permiten controlar y medir muchas variables de la funcionalidad branquial.

En concreto, la técnica empleada en esta tesis, la perfusión de branquias en cabeza aislada, ha sido muy utilizada en este tipo de experimentos (Gardaire *et al.*, 1985; Andersson y Pärt, 1989; Avella y Bornancin, 1989; Block *et al.*, 1991; Pärt y Svanberg, 1981; Pärt *et al.*, 1984; Pärt *et al.*, 1985; etc).

La utilización de este método permite obtener un gran número de datos utilizando un menor número de peces en los experimentos, eliminando el estrés en los mismos y haciendo menos prolongados y costosos los estudios.

Los métodos de perfusión se han aplicado al estudio de la fisiología branquial en varios

temas: intercambio de iones con el medio, estudio de las constantes hemodinámicas e intercambio gaseoso.

En cuanto el estudio del transporte iónico, esta técnica se ha utilizado para examinar el mecanismo de la excreción de amoniaco y la absorción de sodio. Primeramente Payan y colaboradores (1975) estudiaron la bomba de sodio en la preparación de perfusión branquial, en relación con la excreción de amoniaco. También se estudió el efecto de la temperatura y CO_2 (Payan y Matty, 1975). Posteriormente, Payan (1978) estudió el intercambio $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ en la branquia de trucha. Girard y Payan (1980) estudiaron las diferencias en agua dulce y agua salada y la participación de los distintos tipos celulares en la absorción branquial de sodio. Esta línea ha sido seguida por otros autores (Gardaire *et al.*, 1985). La absorción de cloruro está relacionada con la concentración de HCO_3^- y CO_2 (Perry *et al.*, 1984a), y está controlada adrenérgicamente (Perry *et al.*, 1984b).

Perry y colaboradores (1985b) compararon el transporte iónico en la preparación de perfusión branquial usando solución salina de Ringer y sangre como líquido de perfusión, analizando Cl^- , Na^+ y NH_4^+ . Una revisión del tema fue realizada por Avella y Bornancin en 1989.

Muchos estudios hemodinámicos se han realizado en preparación de branquias (Wood, 1974; Payan y Girard, 1977; etc.). En cabeza aislada se ha estudiado como varía la resistencia vascular y el intercambio de oxígeno al añadir adrenalina en el suero (Pärt *et al.*, 1982).

Sobre el intercambio gaseoso, el papel de los eritrocitos y del epitelio branquial en la excreción de CO_2 fue estudiado por Perry *et al.* (1982). Por otra parte, Pärt *et al.* (1984)

estudiaron la tensión de oxígeno antes y después de las branquias concluyendo que debía haber un "shunt" no respiratorio en la segunda laminilla.

En un trabajo posterior, Perry *et al.* (1985a) revisaron el comportamiento de la preparación de branquias en cabeza aislada en cuanto a intercambio gaseoso, equilibrio ácido-base y respuesta hemodinámica, utilizando suero fisiológico o sangre como líquido de perfusión.

Todos estos estudios han hecho que la técnica se constituya como una alternativa *in vitro* al uso de peces (Perry *et al.*, 1984).

2.1. Empleo de la técnica en toxicología.

Dentro del campo de la toxicología, la técnica de la perfusión branquial permite obtener información valiosa sobre la biodisponibilidad de los tóxicos, pues un primer paso de esta consiste en como son captados por los organismos (Pärt, 1990).

La absorción de cadmio ha sido ampliamente estudiada, primero en general (Pärt y Svanberg, 1981). Posteriormente Pärt *et al.* (1985) estudiaron la disponibilidad de cadmio en diferentes calidades de agua. Por otra parte estudiaron la influencia de algunos agentes quelantes como EDTA y citrato en la absorción de cadmio (Pärt y Wikmark, 1984). Posteriormente otros autores han estudiado la absorción de cadmio en presencia de xantatos, así como la distribución intracelular del metal (Block *et al.*, 1991).

Pärt (1989a) estudió con esta técnica la relación del coeficiente de partición octanol-agua y

del pH en la absorción de diversos compuestos orgánicos. Paralelamente estudió las distintas tasas de absorción branquial de fenoles en agua dulce y salada (Pärt, 1989b). La preparación de cabeza de trucha ha sido, asimismo, empleada para estudiar la absorción, metabolismo y eliminación del benzo[a]pyreno, (Andersson y Pärt, 1989).

La absorción de compuestos hidrofóbicos ha sido ampliamente estudiada, en sus aspectos metodológicos (Pärt *et al.*, 1992) en relación con la temperatura (Sijm *et al.*, 1993), con el flujo de sangre y agua (Sijm *et al.*, 1994) y con la alometría (Sijm *et al.*, 1995).

Sijm (1993) observó tasas de absorción comparables para varios compuestos orgánicos y sugirió el método como una alternativa al uso de peces.

Este sistema presenta unas enormes ventajas a la hora de estimar la biodisponibilidad de tóxicos. Para ello habría que adaptarlo para realizar estudios toxicocinéticos. El primer paso para su validación sería comparar las cinéticas para un mismo compuesto, realizadas por el procedimiento tradicional *in vivo* e *in vitro* por el sistema de perfusión branquial.

2.2. Empleo de la técnica en los estudios toxicocinéticos. Aproximación cuantitativa.

El primer objetivo del presente trabajo consistió en buscar un sistema que permitiera realizar comparaciones cuantitativas mediante los cálculos adecuados. Para ello comparamos los valores obtenidos por los métodos convencionales con los hallados con la técnica de perfusión.

Para realizar una comparación de cinéticas *in vivo*- *in vitro* es necesario tener en cuenta el diferente significado de los parámetros calculados. Utilizando el método *in vitro*, es fácil calcular la tasa de aparición y desaparición por la diferencia entre las concentraciones del medio de perfusión y el perfusado recogido después del órgano (Robinson *et al.*, 1993). Esas tasas pueden ser comparadas directamente con la eficiencia *in vivo* de órganos específicos, determinada por la diferencia en la concentración arterio-venosa a través del órgano (Wilkinson y Shand, 1975), pero no con la tasa de eliminación total.

Una forma de realizar comparaciones entre los sistemas *in vivo* e *in vitro* es utilizar los modelos compartimentales. Estos modelos asumen la existencia de un compartimento central en el que el tóxico se distribuye uniformemente y para el que el cambio en la cantidad total de sustancia en el compartimento central, normalizado para la concentración, peso y tiempo es constante y referido a la tasa constante de eliminación. Un cambio equivalente puede ser calculado *in vitro* usando el volumen del compartimento central como referencia. Un abordaje similar puede usarse para realizar comparaciones en la tasa de absorción de la sustancia.

Siguiendo esa pauta comparamos las tasas de absorción de nitritos *in vivo* e *in vitro*. Los nitritos, como hemos visto, tienen una gran importancia en piscicultura y la acción tóxica que despliegan los nitritos en el organismo depende directamente de la absorción de éstos por el mismo. De hecho, las diferencias específicas encontradas en cuanto a sensibilidad a nitritos se deben a diferencias en la tasa de absorción de los mismos (Williams y Eddy, 1988).

Sin embargo, pese a su importancia, no se conoce bien cuál es la vía de entrada. Las branquias han sido consideradas como la ruta principal por la que entran los nitritos en el pez

(Bath y Eddy, 1980; Williams y Eddy, 1988). Sin embargo existe discrepancia al respecto.

Para desarrollar nuestro primer objetivo se usaron comparaciones entre valores *in vivo* y tasas obtenidas de la preparación de perfusión branquial usando conceptos compartimentales. Nuestros resultados, que se resumen en la tabla VIII y se ilustran en la fig. 10, muestran tasas de absorción de nitritos calculadas *in vivo* e *in vitro* muy similares. Estos resultados confirman la hipótesis de otros trabajos (Bath y Eddy, 1980) al mostrar que la absorción de nitritos puede explicarse completamente por el paso a través de las branquias.

Por otra parte, se conocen condiciones de calidad de agua que hacen variar la toxicidad de los nitritos. Por ejemplo, se sabe que la toxicidad para trucha arco iris decrece cuando se incrementan las concentraciones del ion cloruro (Brown, 1993), lo que ha sido citado para otras especies. La relación entre ambos iones se confirma cuando se ha visto que branquias de trucha arco iris expuestas a nitritos tenían mayor número de células del cloruro (Gaino *et al.*, 1984). La absorción, como vemos, va a estar directamente influida por los niveles de cloruros en el medio.

Como puede verse en la figura 9, la preparación de branquias en cabeza aislada nos ha permitido reproducir estos resultados *in vitro*, lo que prueba su capacidad para funcionar con distintas concentraciones de iones en el medio, al igual que en los trabajos *in vivo*.

Las comparaciones *in vivo-in vitro* prueban que la absorción de nitritos puede ser explicada por la absorción branquial y la eficacia de la técnica en relación con su adecuación a los resultados obtenidos *in vivo*. Además, se constata la capacidad de este sistema para

reproducir distintas condiciones ambientales.

A la vista de los resultados, la técnica de perfusión branquial también podría servir para hallar valores cinéticos similares a tasas de absorción y eliminación para determinados compuestos cuya naturaleza hace difícil un estudio convencional. El xileno de almizcle, por ejemplo, es un compuesto aromático de gran hidrofobicidad. Compuestos como éste plantean problemas para hallar tasas de absorción y eliminación en un estudio *in vivo* (Boleas *et al.*, 1996). Sin embargo, estimar de algún modo la biodisponibilidad es de gran interés ya que estos compuestos, sin ser tóxicos para peces, se acumulan en el cuerpo de estos pudiendo pasar al consumo humano.

El siguiente objetivo fue estudiar la cinética del xileno de almizcle utilizando la preparación de branquias en cabeza aislada. Como no podíamos disponer del volumen de distribución del compuesto, que debe ser obtenido *in vivo*, se calcularon una serie de valores, "tasas" de absorción y eliminación de xileno de almizcle, prescindiendo de este parámetro. Sin embargo, como el volumen de distribución es un valor intrínseco para cada compuesto, no conociéndolo podemos, sin embargo, valorar el efecto de una serie de factores como la dieta, factores físicos, calidad del agua, sobre la absorción y eliminación. Los resultados no muestran una gran variabilidad entre las "tasas" para diferentes concentraciones, lo que permite hacer cálculos cinéticos obteniendo valores para compuestos como éste en que son difíciles de conseguir en un estudio *in vivo*. Además se pueden evaluar el efecto de distintos factores lo que permite modificar la absorción o eliminación de un compuesto cuando nos interese.

Por tanto, hemos visto como el sistema de perfusión branquial nos ha permitido realizar estimaciones cuantitativas usando modelos compartimentales. Por la comparación de tasas de absorción *in vivo* - *in vitro*, hemos comprobado que este sistema constituye una buena alternativa a los estudios *in vivo*. En la fig. 19 puede apreciarse como la estructura branquial se mantiene íntegra después de la perfusión branquial. Por otra parte, el sistema nos ha permitido obtener datos sobre la cinética de un compuesto, como el xileno de almizcle, difícil de estudiar *in vivo*. Además, podemos estudiar los efectos de diversos factores sobre la absorción y eliminación de compuestos lo que nos permitirá modificar éstas en la dirección que queramos.

3. La perfusión branquial como modelo para valorar mecanismos toxicocinéticos.

En este punto, nuestro objetivo fue estudiar la eliminación de nitritos, tanto *in vivo* como *in vitro*, y utilizar la técnica de la perfusión branquial para comprender los mecanismos cinéticos implicados.

La cinética de nitritos puede ser descrita por un modelo monocompartimental de primer orden. Como puede comprobarse en la tabla III, existe gran homogeneidad entre los parámetros estimados por el modelo compartimental y aquellos estimados por un modelo no compartimental, lo que indica la bondad del mismo. El valor obtenido para el volumen del compartimento es superior que el volumen plasmático según (Barron *et al.*, 1987), pero menor que el valor medio publicado para fluidos de teleósteos de agua dulce (Holmes y Donalson, 1969). Los mecanismos de toxicidad de los nitritos demuestran la absorción de este contaminante por los hematíes. El volumen observado concuerda con el total volumen

sanguíneo, así, los resultados sugieren la distribución de nitritos en el plasma y hematíes.

Los resultados (tabla IV) sugieren que no se produce una eliminación branquial *in vitro*, o si se produce es inferior a los límites analíticos de detección. Esto contrasta con las tasas de eliminación *in vivo* obtenidas, resumidas en la tabla VIII.

Una posible causa podía ser que la eliminación *in vivo* no era excreción sino transformación metabólica a otros compuestos. Para comprobar esta hipótesis realizamos un experimento *in vitro* que comparara la desaparición de los nitritos con el tiempo en presencia o ausencia de células sanguíneas. Como puede verse en la fig. 6, en las muestras que contenían células sanguíneas los nitritos desaparecieron rápidamente mientras que en las otras muestras, la concentración de éstos se mantenía constante con el tiempo. Estos experimentos *in vitro* sobre el metabolismo y la captación de células sanguíneas demuestran que este mecanismo puede explicar completamente la eliminación real de plasma observada *in vivo*. Los resultados prueban que los hematíes son los responsables de la pérdida de nitritos en sangre o en suero salino Cortland. Los nitritos oxidan la hemoglobina a metahemoglobina, siendo este proceso el principal modo de acción de los nitritos (Lewis y Morris, 1986; Russo et al., 1991). La tasa de formación es cuatro veces mayor para soluciones de hemoglobina que para hematíes, lo que sugiere que la captación a través de la membrana celular es un factor limitante. De este modo no hay cantidades significativas de nitritos eliminadas en el plasma.

Como hemos visto, los datos *in vitro* indican que las branquias no juegan un papel principal en la eliminación de nitritos. De hecho, no se pudo detectar pérdida de nitritos por las branquias, por ello, el límite de detección de la técnica analítica debe ser considerado como

la tasa máxima posible de eliminación (Tabla VIII). Este máximo no explica la eliminación real observada *in vivo*, solo explicable mediante los resultados del experimento de metabolismo y/o captación por hematíes (fig. 8).

Además de la cinética de nitritos que se describe en esta tesis, el aspecto fundamental reside en que se prueba la utilidad de los modelos *in vitro* para estudiar los mecanismos cinéticos de los modelos no mecánicos *in vivo*.

Nuestro siguiente objetivo fue aplicar la técnica de perfusión branquial, con el uso añadido de células sanguíneas dentro del líquido de perfusión, para el estudio de los fenómenos de "binding" y su implicación en la cinética de diversos compuestos. El uso de células en la preparación de perfusión branquial representa una innovación en la técnica y permite investigar el papel de ésta en determinados mecanismos cinéticos. La preparación de branquias en cabeza aislada ha sido ya utilizada con sangre como medio de perfusión (Perry et al., 1985) con el objeto de mejorar las condiciones de funcionamiento, pero no se ha realizado hasta ahora ninguna preparación con células sanguíneas añadidas al suero Cortland utilizado habitualmente.

La capacidad de unión ("binding") de la sangre es, aparentemente, un importante factor en la tasa de absorción (Pärt, 1989a). Nuestros primeros trabajos se orientaron hacia el cobre. En este metal (tabla IX), las branquias muestran una capacidad *in vitro* de eliminar cobre a una velocidad superior que la tasa real observada *in vivo*. La diferencia, un orden de magnitud, sugería que la eliminación de cobre podía estar limitada por la unión del cobre a las proteínas plasmáticas y células. De hecho, la alta afinidad de este metal esencial por

ciertas proteínas ha sido demostrado claramente en varios trabajos (Bettger et al., 1987; Riordan and Gower, 1975).

Preparamos, pues, un experimento en el cual se añadían células al líquido de perfusión en la segunda parte de la preparación. Al añadir las células sanguíneas (fig. 12), la eliminación de cobre *in vitro* se redujo drásticamente, lo que prueba que es esa fracción celular la que retiene *in vivo* al cobre.

Quedaba clara, por tanto, la razón de la discrepancia entre esos valores de cobre *in vivo* e *in vitro*. Por otra parte, sabemos que el xileno de almizcle presenta unos valores de eliminación *in vitro* que no explican la gran persistencia de esta sustancia en los estudios de distribución *in vivo* realizados hasta la fecha.

Cuando se añadieron células a la preparación con xileno de almizcle, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en la eliminación de cobre. La tasas de eliminación pasaron de 1.58 a 1.04 y de 1.8 a 1.1, en ambas preparaciones, como puede verse en la fig. 16. Estos datos concuerdan con los obtenidos *in vivo* (Boleas et al., 1996).

En este apartado, nuestros resultados indican que los modelos *in vitro* y específicamente el método de la perfusión branquial, pueden ser útiles también para la comprensión de los mecanismos cinéticos. La combinación de modelos compartimentales y técnicas *in vitro* aparece como una solución práctica a los estudios toxicocinéticos en peces. Un acercamiento similar, usando un modelo de perfusión de piel porcina ha sido propuesto recientemente para mamíferos (Riviere et al., 1995). Con el sistema de perfusión branquial, mediante la

comparación *in vivo* e *in vitro* hemos valorado los mecanismos concretos que intervienen en la cinética de cada sustancia. Así hemos descubierto, cómo se produce la eliminación de nitritos, y, con el uso de células en el sistema, el mecanismo de eliminación de cobre y xileno de almizcle.

4. La perfusión branquial como modelo para el estudio del ingreso de bacterias.

El segundo bloque del trabajo aquí presentado se centra en la utilización de esta técnica como sistema para estudiar la entrada de partículas y, en concreto, microorganismos patógenos, a través de la branquia.

El estudiar la ruta de entrada de un antígeno tiene su importancia para la respuesta inmune. De hecho, existen numerosos protocolos experimentales desarrollados para valorar el mecanismo de entrada a través de las branquias. Se han utilizado desde modelos *in vivo* que pulverizan la superficie de la branquia con una solución superconcentrada de bacterias, hasta diferentes sistemas *in vitro*, en los que, normalmente, no se mantienen las condiciones fisiológicas del órgano, P. ej., introduciendo uno o varios arcos branquiales en una solución concentrada de bacterias.

Consideramos que el modelo de perfusión branquial utilizado en este trabajo puede ser de enorme utilidad en este tipo de investigaciones, sin embargo, no hemos encontrado ningún estudio al respecto, ya que todos los trabajos anteriores realizados con este sistema se han centrado en valorar respuestas fisiológicas o toxicocinéticas.

Por lo tanto, se realizaron una serie de trabajos preliminares, con el objetivo único de valorar las posibilidades de este sistema. Para ello, se desarrollaron dos tipos de experimentos: uno con partículas inertes, bolas de latex, comunmente utilizadas en estudios *in vitro* sobre fagocitosis, y la otra, directamente con bacterias, seleccionando dos microorganismos con características opuestas. El primero, *Y. ruckeri*, responsable de un proceso agudo y para el que la evidencia disponible indica que la branquia es un lugar característico de entrada al organismo. El segundo, *R. salmoninarum*, microorganismo intracelular y responsable de un proceso caracterizado por un cuadro crónico, y para el que, hasta la fecha, todos los intentos realizados para demostrar su entrada a través de las branquias han dado resultados negativos.

En principio, los lugares de captación en una exposición en agua serían las branquias, piel e intestinos (Zapata *et al.*, 1987). De ellos, la mayoría de los autores señalan las branquias como el principal lugar de captación de antígenos (Alexander *et al.*, 1981; Smith, 1982; Nelson *et al.*, 1985). De hecho la propia estructura de la laminilla secundaria en la que la sangre y el agua sólo están separadas por dos capas de células epiteliales, hace estos órganos muy adecuados para la captación de antígenos.

Se plantean aquí dos teorías: una selectiva, que postula que la discriminación del antígeno a través de determinantes específicos o receptores en la superficie de la célula branquial y una teoría no selectiva que sostiene que la determinación de una respuesta inmune activa contra antígenos específicos es posterior a la internalización del inmunógeno (Anderson *et al.*, 1984).

4.1. Uso de partículas inertes.

En algunos trabajos, se han utilizado bolitas de látex como modelo de antígeno particulado. En estudios *In vitro*, Torroba *et al.* (1993) encontraron que bolitas fluorescentes no traspasaban el epitelio branquial pues se embebieron en el mucus, mientras que las conjugadas a antígeno O de *Yersinia ruckeri* si penetraron en las células epiteliales. Al principio también parece que *Y. ruckeri* pasó más pronto que el antígeno O. Desde luego, puede influir la duración del experimento, que en el caso de este trabajo tuvo un máximo de 30 min. Estos mismos autores creen que la captación debe ser más rápida *in vivo*, sugiriendo una especificidad en el mecanismo de captación. Para ello, se postula que habría receptores específicos en las células (Anderson *et al.*, 1984).

El papel de las células epiteliales de la branquia en la captación de materiales antigénicos y no antigénicos se ha sugerido en varios animales acuáticos. Smith (1982) encontró radioactividad dentro de células branquiales tras un baño de trucha arco iris con bolitas de látex radiomarcadas. Goldes *et al.* (1986) demostraron la fagocitosis de material inerte (caolín) por las células epiteliales y fagocitos de las branquias de trucha arco iris.

Los mecanismos de captación y transporte de antígenos particulados en peces no se conocen bien todavía (Moore *et al.*, 1994) . Estos mismos investigadores encontraron *in vivo* una baja captación por macrófagos en la epidermis. Un tratamiento previo con cloruro sódico aumentó la captación. El mucus branquial juega un papel importante en minimizar el contacto de las partículas con las laminillas en los peces juveniles que ellos emplearon. La captación también crece al aumentar el tiempo de exposición. Las bolitas se observaron primero dentro de las

células del epitelio branquial y en epidermis descamada junto a la línea lateral. Ambos, branquia y piel, son los sitios implicados para la captación de antígeno particulado durante la exposición en flujo continuo. Si se realiza una inyección intraperitoneal, se encuentran las bolitas en sangre periférica, después hay una acumulación en riñón y bazo. (Moore *et al.*, 1994).

Nuestros resultados confirman el paso de partículas desde el medio externo al epitelio branquial, donde se observaron partículas de látex fluorescentes lo que puede apreciarse en la figura 17. No se encontraron estas partículas en el líquido de perfusión, lo que seguramente es debido a la corta duración de la preparación.

4.2. Utilización de bacterias.

Hemos visto que el sistema de perfusión branquial de cabeza de trucha permite estudiar el paso de partículas inertes a través de la branquia, pudiendo utilizarse como modelo de infección. Para validar este sistema, estudiamos el ingreso branquial de dos bacterias de gran interés para la acuicultura: *Yersinia ruckery* y *Renibacterium salmoninarum*.

La enfermedad renal bacteriana (BKD), producida por la bacteria *Renibacterium salmoninarum*, ocasiona grandes pérdidas en piscicultura sin que hasta ahora se haya podido controlar satisfactoriamente. En parte, las dificultades en controlar BKD provienen del desconocimiento de la patogenia de dicha enfermedad pues la ruta exacta de entrada de *R. salmoninarum* todavía no está determinada sin discusión. Al menos, hay evidencias de respuesta inmunitaria a BKD, de tipo humoral y de base celular, lo que abre el camino hacia

la profilaxis vacunal.

Sobre el ingreso en el organismo, el primer paso puede la adhesión a las células del hospedador en los que intervienen las propiedades de hemaglutinación e hidrofobicidad de la bacteria. Se entendía que *R. salmoninarum* era un patógeno intracelular con la habilidad de entrar, sobrevivir, y multiplicarse rápidamente dentro de las células de fagocitosis del hospedador. Rose and Levine (1992) sugieren un mecanismo de entrada que consiste en una unión al factor C3b del complemento seguida por una unión a macrófagos que lleven receptores C3b, internalización de la superficie de los receptores. (Evenden et al., 1993). Otros autores sostienen que los antígenos son primeramente captados por células epiteliales y posteriormente son englobados por macrófagos branquiales (Zapata et al., 1987).

En nuestras preparaciones no se pudo encontrar *Renibacterium* ni en las muestras de líquido de perfusión ni en el tejido branquial. Estos resultados están de acuerdo con considerar a *Renibacterium* como una bacteria que actúa lentamente en la invasión de los tejidos aunque no descartan su ingreso vía branquia como sostienen otros autores (Robohm y Koch, 1995).

Chilmonczyk (1979) no pudo demostrar la entrada de antígeno por las branquias. Otros autores sostienen que el mecanismo de entrada de antígenos es a través de lesiones en el epitelio (Bowers and Alexander, 1981, 1982; Alexander *et al.*, 1982). Sin embargo, nuestros resultados confirman que, acciones que dañan el epitelio, como quedó probado histológicamente no facilitaron la entrada de *Renibacterium*. Así, de las preparaciones que se realizaron con tóxicos tampoco se pudo aislar *Renibacterium*.

Por el contrario, nuestros resultados demuestran el paso de *Yersinia* a través de la branquia al encontrarse bacterias marcadas en el epitelio branquial por la prueba de inmunohistoquímica (fig. 18). No se encontraron en líquido de perfusión lo que confirma que quizá la preparación tenga poca duración para que sea posible ese hallazgo.

Los experimentos de esta última parte nos demuestran como el sistema de perfusión branquial en cabeza aislada es capaz de reproducir la entrada de agentes patógenos en el pez. Hemos visto como *Y. ruckeri* atraviesa la branquia, tal y como se sabía por estudios in vivo. Sin embargo, *R. salmoninarum* no es capaz de atravesar el epitelio branquial en el tiempo que dura la preparación, lo que concuerda con la patogenia de la BKD. Estos hallazgos nos confirman la utilidad de la técnica para reproducir el ingreso de agentes patógenos y partículas inertes lo que es de una gran utilidad a la hora de combatir la enfermedad y a la hora de prevenirla mediante el desarrollo de vacunas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El sistema de perfusión branquial en cabeza de trucha permite estimaciones cuantitativas, mediante el uso de modelos compartimentales, de las tasas de absorción y eliminación de los contaminantes químicos. Los resultados obtenidos para la absorción de nitritos demuestran que las tasas estimadas por este modelo, una vez validadas, constituyen una alternativa perfecta a los estudios *in vivo*.
2. El sistema es particularmente útil para la obtención de datos sobre biodisponibilidad en compuestos cuyo estudio *in vivo* resulta complejo. En este sentido, se presentan valores de absorción y eliminación del xileno de almizcle que permiten predecir el comportamiento de esta sustancia y valorar posibles sistemas para reducir la absorción o aumentar su eliminación.
3. El sistema, asimismo, permite valorar mediante la comparación de las tasas *in vitro* - *in vivo*, los mecanismos concretos que intervienen en la cinética de cada sustancia, valorando el papel específico del epitelio branquial y el de otros órganos y tejidos, incluyendo, las propias células sanguíneas.
4. Una de las innovaciones planteadas en este estudio, la inclusión de células sanguíneas en el líquido de perfusión, abre nuevas posibilidades, no sólo para la valoración de este tipo de mecanismos sino también para validar el sistema en la predicción del comportamiento branquial ante todo tipo de agentes, incluyendo microorganismos patógenos.

-
5. Los resultados indican que los nitritos, entran en el pez con una tasa de absorción de 0.011 ± 0.002 y que esta absorción puede explicarse completamente por el paso a través del epitelio branquial. Sin embargo, en la eliminación, con una tasa de 0.033 ± 0.007 , las branquias no juegan un papel relevante sino que el mecanismo fundamental es el metabolismo y/o captación por los hematíes.
6. La eliminación potencial de cobre por el epitelio branquial, con una tasa *in vitro* de 0.038 ± 0.024 , es diez veces mayor que la realmente observada. Los resultados obtenidos demuestran que esta diferencia se debe al papel de las células sanguíneas, cuya presencia reduce drásticamente la eliminación de cobre por el epitelio.
7. Un efecto semejante ha podido observarse también para la eliminación de xileno de almizcle. La eliminación de este compuesto se reduce por un factor de un tercio en presencia de células sanguíneas.
8. El sistema de perfusión branquial de cabeza de trucha permite estudiar el paso de partículas inertes a través de la branquia, pudiendo utilizarse como modelo de infección. La presencia de bolas de latex en el epitelio indica la capacidad de este para captar partículas del exterior.
9. El sistema de perfusión branquial en cabeza aislada de trucha arco iris ha demostrado ser capaz de reproducir la entrada de agentes patógenos en el pez. *Y. ruckeri* atraviesa la branquia, tal como se ha demostrado en los estudios de inmunohistoquímica. *R.*

salmoninarum no es capaz de atravesar la branquia en el tiempo que dura la preparación. Estos resultados coinciden con los esperados en función de la patogenia de los procesos patológicos producidos por estos dos agentes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alabaster, J.S. y Lloyd, R. 1980. Water quality criteria for freshwater fish. Butterworths, London.

Alexander, J. B., Bowers, A. y Shamshoom, S. M. 1981. Hyperosmotic infiltration of bacteria into trout: route of entry and the fate of the infiltrated bacteria. En: Anderson, D. P. y Hennesen, W. (Eds.) "Fish biologics: serodiagnostics and vaccines". Basel, Suiza.

Alexander, J. B., Bowers, A., Ingram, G. A. y Shamshoom, S. M. 1982. Th portal of entry of bacteria into fish during hyperosmotic infiltration of the fate of antigens. Dev. Comp. Immunol. Suppl., 2: 41-46.

Anderson, D. P., Van Muiswinkel, W. B. y Roberson, B. S. 1984. Effects of chemically induced immune modulation on infectious diseases of fish. En: "Chemical regulation of immunity in veterinary medicine". Alan R. Liss Inc, New York.

Anderson, T. y Pärt, P. 1989. Benzo[a]pyrene metabolism in isolated perfused rainbow trout gills. Marine Environmental Research, 28: 3-7.

Archer, M. C., Clark, S. D., Thilly, J. E. y Tannenbaum, S.R. 1971. Environmental nitroso compounds: reaction with creatine and creatinine. Science 174: 1341-1343.

Austin, B., Rayment, J. y Aldeman, D. J. 1983. Control of furunculosis by oxolinic acid. *Aquaculture*, 31:101-108.

Austin, B., y Austin, D. A. 1987. *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. Ellis Horwood Limited, New York.

Avella, M. y Bornancin, M. 1989. A new analysis of ammonia and sodium transport through the gills of the freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. exp. Biol.*, 142: 155-175.

Babor, J. A. e Ibartz, J. 1973. *Química general moderna*. Ed. Marín, Madrid.

Barron, M.G., Stehly, G.R. y Hayton, W.L. 1990. Pharmacokinetic modeling in aquatic animals. I. Models and concepts. *Aquatic Toxicology*, 18: 61-86.

Bath, R. N. y Eddy, F. B. 1980. Transport of nitrite across fish gills. *J. exp. Zool.*, 214: 119-121.

Beckman, B. R. y Zaugg, W. S. 1988. Copper intoxication in chinook *salmon* *Oncorhynchus tshawytsche* induced by $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$, in hematocrit, and plasma glucose. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 1430-1435.

Bettger, W. J., Spry, D. J., Cockell, K. A., Cho, C. Y. y Hilton, J. W. 1987. The distribution of zinc and copper in plasma, erythrocytes and erythrocyte membranes in rainbow trout. *Comparative Biochemical Physiology*, 87: 445-452.

- Bilinski, E. y Jonas, R. R. E. 1973. Effects of cadmium and copper on the oxidation of lactate by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills. J. Fish. Res. Bd. Can., 30: 1553-1558.
- Blanco, M. 1994. La trucha. Cria en cautividad. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Block, M., Wicklund Glynn, A. y Pärt, P. 1991. Xanthate effects on cadmium uptake and intracellular distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. Aquatic Toxicology, 15: 267-283.
- Boleas, S., Fernández, C. y Tarazona, J.V. 1995. Musk xylene. Study of bioaccumulation and ethoxy resorufin o-deethylase response in rainbow trout. Fifth SETAC-Europe Congress. Copenague, junio 1995.
- Boleas, S., Fernández, C. y Tarazona, J.V. 1996. Toxicological and kinetic study of musk xylene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Bull. environ. contam. Toxicol (Aceptado)
- Bornancin, J., Isaia, J. y Masoni, A. 1985. A re-examination of the technique of isolated, perfused trout head preparation. Comp. Biochem. Physiol., 81(1): 35-41.
- Bowers, A. y Alexander, J. B. 1981. Hyperosmotic infiltration: immunological demonstration of infiltrating bacteria in brown trout, *Salmo trutta* L. J. Fish Biol., 18: 9-13.
- Boyd, C. E. 1981. Water quality in warmwater fish ponds. Auburn University, Opelika.

Brown, L. 1993. Aquaculture for veterinarians. Pergamon Press. Oxford.

Brucke, D. (1991). Current approaches to the study of pollution-related diseases in fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 11:46-53.

CAICYT. 1988. Patología en acuicultura. FEUGA. Madrid.

Carballo, M. y Muñoz, M. J. 1991. Effect of sublethal concentrations of four chemicals on susceptibility of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to saprolegniosis. Appl. Environm. Microbiol, 57: 1813-1816.

Carbonell, G. y Tarazona J.V. 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology 29: 213-221.

Chilmonczyk, S. 1979. Some aspects of trout gill structure in relation to egtved virus infection and defence mechanisms. En: Ahne, W. (Ed.) "Fish diseases". Springer Verlag, Berlin.

Cyriac, P. J., Antony, A. y Nambisan, P. N. K. 1989. Hemoglobin, and hematocrit values in the fish *Oreochromys mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. Bull Environ. Contam. Toxicol., 43: 315-320.

De la Cruz, J. A., Rodríguez, A., Tejedor, C., de Lucas, E. y Orozco, L. R. 1986. Isolation and identification of *Yersinia ruckeri*, causal agent of the enteric redmouth disease

(ERM), for the first time in Spain. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 6: 43-44.

Drummond, R. A., Spoor, W. A. y Olson, G. F. 1973. Short-term indicators of sublethal effects of copper on brook trout, *Salvelinus fontinalis*. J. Fish. Res. Bd. Can., 30: 698-701.

EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission). 1984. Water quality criteria for European freshwater fish. Report on nitrite an freshwater fish. EIFAC Technical Paper 46, F.A.O. Roma.

Ellis, A. G. y Smith, D. G. 1983. Oedema formation and impaired O₂ transfer in Ringer-perfused gills of the eel, *Anguilla australis*. J. Exp. Zool., 227: 371-380.

Erickson, R.J. y McKim, J.M. 1990. A model for exchange of organic chemicals at fish gills: flow and diffusion limitations. Aquatic toxicology, 18: 175-198.

Evans, D.H., Claiborne, J.B., Farmer, L., Mallery, C., y Krasny, E.J. 1982. Fish gill ionic transport: methods and models. Biol. Bull., 163:v 108-130.

Evenden, A. J., Grayson, T. H., Gilpin, M. L. y Munn, C. B. 1993. *Renibacterium salmoninarum* and bacterial kidney disease- the unfinished jigsaw. Annual Rev. of Fish Diseases, 87-104.

Farrell, A.P., Small, S. y Graham, M.S. 1989. Effect of heart rate and hypoxia on the

performance of a perfused trout heart. Can. J. Zool., 67: 274-280.

Fernández, C., Boleas, S. y Tarazona, J.V. (1995) Tissue distribution of musk xylene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fifth SETAC-Europe Congress. Copenague, junio 1995.

Fernández, F. J. y Kahn, H. L. 1971. Clinical methods for atomic absorption spectroscopy. Clin. Chem. Newsl. 3, 24.

Figueroa, J., Concha, M. I., Castro, R. y León, G. 1995. A PCR assay based on specific DNA probes for the detection of *R. salmoninarum* in biological samples. E.A.F.P. Seventh International Conference "Diseases of fish and shellfish". Palma de Mallorca, Septiembre.

Frazier, J. M. 1995. Application of *in vitro* systems to the prediction of *in vivo* biokinetics. Toxicology in vitro, 9(4): 527-536.

Gaino, E., Arillo, A. y Mensi, P. 1984. Involvement of the gill chloride cells of trout under acute nitrite intoxication. Comparative Biochemistry and Physiology, 77A: 611-617.

Gardaire, E., Avella, M., Isaia, J., Bornancin, M. y Mayer-Gostan, N. 1985. Estimation of sodium uptake through the gill of the rainbow trout *Salmo gairdneri*. Exp. Biol., 44: 181-189.

Giesy, J. P., Alberts, J. J. y Evans, D. W. 1986. Conditional stability constants and binding

capacities for copper (II) by dissolved organic carbon isolated from surface waters the southeastern united States. *Envir. Toxicol. and Chem.*, 5:139-154.

Girard, J.P. y Payan, P. 1980. Ion exchanges through respiratory and chloride cells in freshwater- and seawater-adapted teleosteans. *Am.J.Physio.* 238: 260-268.

Golde, S. A., Ferguson, H. W., Daoust, P. Y. y Moccia, R. D. 1986. Phagocytosis of the inert suspended clay kaolin by the gills of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 9: 147-151.

Gudmundsdottir, S., Benediktsdottir, E. y Helgason, S. Detection of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney samples: a comparison of results using double-sandwich ELISA and isolation on selective medium.

Handy, R.D. y Eddy, F.B. 1991. Effects of inorganic cations on Na⁺ adsorption to the gill and body surface of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in dilute solutions. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1829-1837.

Hart, B. T. y Davies, S. H. R. 1979. AWRC Technical paper n° 35. Australian Gov. Printing Service, Camberra.

Helbling, K. S., Schmid, P. y Schlatter, C. 1994. The trace analysis of musk xylene in biological samples: problems associated with its ubiquitous occurrence. *Chemosphere*, 29: 477-484.

Hellawell, J. M. 1988. Toxic substances in rivers and streams. *Environmental Pollution*, 50: 61-85.

Hetrick, F. M., Knittel, M. D. y Fryer, J. L. 1979. Increased susceptibility of rainbow trout to infectious haematopoietic necrosis virus after exposure to copper. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 198-201.

Holmes, W. N., y Donaldson, E. M. 1969. The body compartments and the distribution of electrolytes. En: Hoar, W. S. y Randall, D. J. (Eds.) "Fish Physiology I". Academic Press, Orlando.

Hodson, P. V. 1988. The effect of metal metabolism on uptake disposition and toxicity in fish. *Aquatic Toxicology*, 11: 3-18.

Høie, S. 1995. The suitability of PCR detect bacterial pathogens in fish. E.A.F.P. Seventh International Conference "Diseases of fish and shellfish". Palma de Mallorca, Septiembre.

Horsberg, T.E. 1994. Experimental methods for pharmacokinetics studies in salmonids. *Annual Review of Fish Diseases*, 4: 345-358.

Houston, J.B. 1994. Relevance of *in vitro* kinetic parameters to *in vivo* metabolism of xenobiotics. *Toxicology in vitro*, 4: 507-512.

Josuweit, H. 1995. Aquaculture production and trade world wide survey. *Cahiers Options*

méditerranéennes, 14: 9-28.

Klontz, G.W. y Smith, L.S. 1968. Methods of using fish as biological research subjects. In: Gay, W.I. (Ed). Methods of animal experiments. Vol III. Academic Press, New York and London, pp. 323-385.

Krakow, N. P. 1913. Über die Wirkung von Giften auf die Gefässe isolierter Fischkiemen. Pfluegers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere, 151: 583-603.

Lacroix, D. 1995. La production aquacole dans les pays méditerranéens: synthèse 1992-1994. Cahiers Options méditerranéennes, 14: 29-52.

Lauren, D. J. y McDonald, D. G. 1986. Influence of water hardness, pH, and alkalinity on the mechanism of the copper toxicity. Can. J. Fish Aquat. Sci., 43: 1488-1496.

Lauren, D. J. y McDonald, D. G. 1987. Acclimation to copper by rainbow trout: physiology. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44: 99-104.

Left, P. F., Farmer, G. J. y Beamish, F. W. H. 1976. Effect of copper on some aspects of the bioenergetics of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish. Res. Bd. Can., 33, 1335-1342.

Lewis, W. M. Jr. y Morris, D. P. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. Transactions of the American Fisheries Society, 115: 183-195.

- Lloyd, R. 1961. Effect of dissolved-oxygen concentration on the toxicity of several poisons to rainbow trout *Salmo gairdneri*. J. Exper. Biol., 38: 447-455.
- Lloyd, R. 1992. Pollution and freshwater fish. Fishing New books, Oxford.
- McKim, J.M. y Erickson, R.J. 1991. Environmental impacts on the physiological mechanisms controlling xenobiotic transfer across fish gills. Physiological Zoology, 64(1): 39-67.
- Merck Index. 1989. Merck & Co. Inc. Rahway, U.S.A.
- Miller, T. G. y McKay, W. C. 1980. The effects of hardness, alkalinity and pH of test water on the toxicity of copper to rainbow trout *Salmo gairdneri*. Water Research, 14: 129-133.
- Moore, J. D., Ototake, M. y Nakanishi, T. 1994. Uptake and transport of particulate antigens during bath and intra-peritoneal immunization. International Symposium on Aquatic Animal Health, September 4-8, Seattle Washington, USA.
- M.O.P.U. 1983. Análisis de calidad de las aguas. M.O.P.U. Servicio de Publicaciones.
- Muñoz, M. J., Carballo, M., y Tarazona, J. V. 1991. The effect of sublethal levels of copper and cyanide on some biochemical parameters of rainbow trout along subacute exposition. Comp. Biochem. Physiol., 100: 577-582.

Nelson, J. S., Rohovec, J. S. y Fryer, J. L. 1985. Tissue localiztion of *Vibrio* bacterin delivered by intraperitoneal injection, immersion and oral routes to *Salmo gairdneri*. Fish Pathol., 19: 263-269.

Pagencopf, G. K., Russo, R. M. y Thurston, R. 1974. Effect of complexation on toxicity of copper to fishes. J. Fish. Res. Bd. Can., 31: 462-465.

Parker, N. (1986). Stress and its complications in cultured fishes en "Trends and problems in aquaculture development". Ed. Grimaldi and Rosenthal. Verona.

Pärt, P. 1989a. Comparison of absorption rates of Halogenated phenols across fish gills in fresh and marine water. Marine Environmental Research, 28: 275-278.

Pärt, P. 1989. Bioavailability and uptake of xenobiotics in fish. En "Chemicals in the aquatic environment". Lars Landner (Ed.). Springer-Verlag. Berlin.

Pärt, P. 1990. The perfused fish gill preparation in studies of the bioavailability of chemicals. Ecotoxicology and environmental safety, 19: 106-115.

Pärt, P. y Svanberg, O. 1981. Uptake of cadmium in perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38: 917-924.

Pärt, P., Kiessling, A. y Ring, O. 1982a. Adrenalin increases vascular resistance in perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) gills. Comp. Biochem. Physiol., 72c (1): 107-108.

Pärt, P., Tuurala, H. y Soivio, A. 1982b. Oxygen transfer, gill resistance and structural changes in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) gills perfused with vasoactive agents. Comp. biochem. Physiol., 71C: 7-13.

Pärt, P., Tuurala, H., Nikinmaa, M. y Kiessling, A. 1984. Evidence for a non-respiratory intralamellar shunt in perfused rainbow trout gills. Comp. Biochem. Physiol, 79A: 29-34.

Pärt, P. y Wikmark, G. 1984. The influence of some complexing agents (EDTA and citrate) on the uptake of cadmium in perfused rainbow trout gills. Aquatic toxicology, 5: 277-289.

Pärt, P., Svanberg, O. y Kiessling, A. 1985. The availability of cadmium to perfused rainbow trout gills in different water qualities. Water Res., 19: 427-434.

Pärt, P., Saarikoski, J., Tuurala, H. y Havaste, K. 1992. The absorption of hydrophobic chemicals across perfused rainbow trout gills: methodological aspects. Ecotoxicology and environmental safety, 24: 275-286.

Payan, P. 1978. A study of the $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange across the gill of the perfused head of the trout (*Salmo gairdneri*). J. comp. Physiol, 124: 181-188.

Payan, P. y Girard, J. P. 1977. Adrenergic receptors regulating patterns of blood flow through the gills of trout. Am. J. Physiol, 232: 18-23.

Payan, P. y Matty, A.J. 1975. The characteristics of ammonia excretion by a perfused

isolated head of trout (*Salmo gairdneri*): effect of temperature and CO₂ -free ringer.

Payan, P., Matty, A.J. y Maetz, J. 1975. A study of the sodium pump in the perfused head preparation of the trout *Salmo gairdneri* in freshwater. J. Comp. Physiol, 104: 33-48.

Perry, S.F., Davie, P.S., Daxboeck, C. y Randall, D.J. 1982. A comparison of CO₂ excretion in a spontaneously ventilating blood-perfused trout preparation and saline-perfused gill preparations: contribution of the branchial epithelium and red blood cell. J. exp. Biol., 101: 47-60.

Perry, S.F., Davie, P.S., Dayboeck, C., Ellis, A.G. y Smith, D.G. 1984a. Perfusion methods for the study of Gill physiology. en "Fish physiology". W.S. Hoar y D.J. Randall (Eds.). Vol X part B. Academic Press. Orlando, Florida.

Perry, S.F., Payan, P. y Girard, J.P. 1984b. Effects of perfusate HCO₃⁻ and PCO₂ on chloride uptake in perfused gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41: 1768-1773.

Perry, S.F., Payan, P. y Girard, J.P. 1984c. Adrenergic control of branchial chloride transport in the isolated perfused head of the freshwater trout (*Salmo gairdneri*). J. Comp. Physiol. B., 154: 269-274.

Perry, S.F., Booth, C.E. y McDonald, D.G. 1985. Isolated perfused head of rainbow trout. I. Gas transfer, acid-base balance, and hemodynamics. Am. J. Physiol. 249: 246-254.

Perry, S.F., Booth, C.E. y McDonald, D.G. 1985. Isolated perfused head of rainbow trout. II. Ionic fluxes. *Am. J. Physiol.* 249: 255-261.

Plá, J.M. y Pozo, A. 1974. *Manual de biofarmacia*. Facultad de Farmacia, Barcelona.

Plumb, J. A. 1984. Relationship of water quality and infectious diseases in cultured channel catfish. *Symposia Biologica Hungarica*, 23: 189-198.

Reichenbach-Klinke, H. H. 1982. *Enfermedades de los peces*. Ed. Acribia. Zaragoza.

Reite, O. B. 1966. The evolution of vascular smooth muscle responses to histamine and 5-hydroxytryptamine. I. Occurrence of stimulatory actions in fish. *Acta Physiol. Scand*, 75: 221-239.

Rimkus, G.G. y Wolf, M. 1995. Nitro musk fragrances in biota from freshwater and marine environment. *Chemosphere*, 30 (4): 641-651.

Riordan, J. R. y Gower, I. 1975. Purification of low molecular weight copper proteins from copper loaded liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 66: 678-686.

Riviere, J. E., Brooks, J. D., Williams, P. L. y Monteiro-Riviere, N. A., 1995.

Roberts, R. J. 1981. *Patología de los peces*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

Roberts, R. J. y Shepherd, C. J. 1986. Handbook of trout and salmon diseases. Fishing News Books. Surrey, England.

Robinson, M. K., Barfuss, D. W. y Zalups, R. K. 1993. Cadmium transport and toxicity in isolated perfused segments of the renal proximal tubule. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121: 103-111.

Rodriguez-Moreno, P. A. y Tarazona, J.V. 1994. Nitrite-induced methemoglobin formation and recovery in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at High Chloride Concentrations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53: 113-119.

Rose, A. S. y Levine, R. P. 1992. Complement-mediated opsonisation and phagocytosis of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2: 223-240.

Rosenthal, H. 1989. Water quality: problems and solutions. En "Aquaculture. A biotechnology in progress". De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H. y Wilkins, N. European Aquaculture Society, Bredene, Belgica.

Rucker, R. R. 1966. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Off. Int. Epizootics*, 65: 825-830.

Russo, R. C. y Thurston, R. V. 1991. Toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to fishes. En "Aquaculture and water quality". Brune, D. E. y Tomasso, J. R. (Eds.) The World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Schreck, C. B. y Hiram, W. L. 1991. Performance capacity of fish: stress and water quality. En "Aquaculture and water quality". Brune, D. E. y Tomasso, J. R. (Eds.) The World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Sellers, C. M. Jr., Heath, A. G. y Bass, M. L. 1975. The effect of sublethal concentrations of copper and zinc on ventilatory activity, blood oxygen and pH in rainbow trout *Salmo gairdneri*. Water Research, 9: 401.

Shepherd, J. 1988. What is fish farming? en "Intensive fish farming". Shepherd, J. y Bromage, N. (Eds.). BSP Professional Books, Oxford.

Sijm, D.T.H.M. 1993. Uptake of organic chemicals across fish gills: alternatives to the use of fish populations. ATLA, 21: 453-456.

Sijm, D.T.H.M., Pärt, P. y Opperhuizen, A. 1993. The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 25: 1-14.

Sijm, D.T.H.M., Verberne, M.E., Pärt, P. y Opperhuizen, A. 1994. Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquatic Toxicology, 30: 325-341.

Sijm, D.T.H.M., Verberne, M.E., De Jonge, W.J., Pärt, P. y Opperhuizen, A. 1995.

Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicology and Applied Pharmacology, 131: 130-135.

Smith, P. D. 1982. Analysis of the hyperosmotic and bath methods for fish vaccination. Comparison of uptake of particulate and non-particulate antigens. Dev. Comp. Immunol. Suppl.,2: 181-186.

Smith, C. E. y Williams, W. G. 1974. Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. Transactions of the American Fisheries Society, 103: 389-390.

Smart, G.R.(1981): Aspects of water quality producing stress in intengwve fish culture. En "Stress and fish". Academic Press. Londres.

Starliper, C. E. y Teska, J. D. 1995. Relevance of Renibacterium salmoninarum in an asymptomatic carrier population of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). Journal of Fish Diseases, 18: 383-387.

Stiff, M. J. 1971. Copper/bicarbonate equilibria in solutions of bicarbonate ion at concentrations similar to those found in natural waters. Water Res., 5: 585.

Tarazona, J.V., Muñoz, M.J., Carbonel, G., Carballo, M., Ortiz, J.A. y Cebrián, M. 1990. Estudio de la calidad del agua en las piscifactorias españolas. Análisis estadístico. Actas III Congreso Nac. Acuicult.: 917-922.

- Tarazona, J. V. y Muñoz, M. J. 1995. Water quality in salmonid culture. *Reviews in fisheries Science*, 3(2): 109-139.
- Tomasso, J. R. y Brune, D. E. 1991. Aquacultural water quality: the emergence of an applied discipline. En "Aquaculture and water quality". Brune, D. E. y Tomasso, J. R. (Eds.) The World Aquaculture Society, Baton Rouge.
- Torroba, M., Anderson, D. P., Dixon, O. W., Casares, F., Varas, A., Alonso, L., Gómez del Moral, M. y Zapata, A. G. 1993. *In vitro* antigen trapping by gill cells of the rainbow trout: an immunohistochemical study. *Histology and Histopathology*, 8: 363-367.
- Vallejos, J., Monras, M., Cubillos, V., Paredes, E. y Canal, A. 1995. Production of monoclonal antibodies specific to *Yersinia ruckeri* and development of diagnostic technics. E.A.F.P. Seventh International Conference "Diseases of fish and shellfish". Palma de Mallorca, Septiembre.
- Wagner, J. G. 1983. Farmacocinética clínica. Ed. Reverté. Barcelona.
- Waiwood, K. G., y Beamish, F. W. H. 1978. The effect of copper, hardness and pH on the growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish Biol*, 13: 591-598.
- White, M. R., Wu, C. C. y Albregts, S. R. 1995. Comparison of diagnostic tests for bacterial kidney disease in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 494-499.

Wilkinson, G. R. y Shand, D. G. 1975. A physiological approach to hepatic drug clearance. *Clinical and Pharmacological Therapeutics*, 18: 377-390.

Williams, E. M. y Eddy, F. B. 1988. Regulation of blood haemoglobin and electrolytes in rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson) exposed to nitrite. *Aquatic Toxicology*, 13: 12-28.

Wolf, K. 1963. Physiological salines for freshwater teleosts. *Prog. Fish. Cult.* 25:135-140.

Wood, C. M. 1974. A critical examination if the physical and adrenergic factors affecting blood flow through the gills of the rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 60: 241-265.

Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S. y Akiyama, D. 1983. Synthetic musk residues in biota and water from Tam river and Tokyo bay (Japan). *Archive of Environmental Contamination and toxicology*, 12: 83-89.

Zapata, A. G., Torroba, M., Alvarez, F., Anderson, D. P, Dixon, O. W. y Wisniewski, M. 1987. Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *J. Fish. Biol.*, 31: 209-217.